食品の安全性及び機能性に関する総合研究-安全性-（プロジェクト研究成果シリーズ445）

誌名	食品の安全性及び機能性に関する総合研究
巻/号	445号
掲載ページ	p. 1-384
発行年月	2008年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波事務所
Tsukuba Office, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

研究成果445（2008・1）

食品の安全性及び機能性に関する総合研究
－安全性－

Integrated Research Program for Functionality and Safety of Food
Toward an Establishment of Healthy Diet.
－Safety－

農林水産省農林水産技術会議事務局

食品の安全性及び機能性に関する総合研究
－安全性－

Integrated Research Program for Functionality and Safety of Food
Toward an Establishment of Healthy Diet.
－Safety－

２００８年１月

序　　文

研究成果シリーズは、農林水産省農林水産技術会議が研究機関に委託して推進した研究の成果を、総合的かつ体系的に取りまとめ、研究機関及び行政機関等に報告することにより、今後の研究及び行政の効率的な推進に資することを目的として刊行するものである。

この第455集「食品の安全性及び機能性に関する総合研究－安全性－」は、農林水産省農林水産技術会議の食品安全研究として、2002年度から2005年度までの４年間にわたり、独立行政法人食品総合研究所（現　独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所）を中心に実施した研究成果を取りまとめたものである。

BSE（牛海綿状脳症）問題、食品の偽装表示問題等、「食」と「農」に関する様々な問題が顕在化し、一般消費者の食品に対する信頼を急速に失わせるなど社会的に大きな問題となっている。このため農場から食卓までのフードチェーン全体を通した安全性の確保が課題となっており、科学的根拠に基づくリスク分析の原則に従った対応が必要とされている。

本研究では、リスク低減のための殺菌・流通技術及び危害検知技術の開発など食品の安全性に関するリスク分析に係る技術開発、食品の表示や履歴について科学的裏付けを確保する技術開発を行うとともに、信頼度の高い分析データ提供システムの基盤を構築することを目的とした。

この研究の成果は、今後の農林水産関係の研究開発及び行政を推進する上で有益な知見を与えるものと考え、関係機関に供する次第である。

最後に、本研究を担当し、推進された方々の労に対し、深く感謝の意を表する。

2008年１月

農林水産省農林水産技術会議事務局長

竹谷　廣之

目　　次

研究の要約 …… 1

第1編　トレーサビリティ・品質表示の裏付けとなる研究開発 …… 37
第1章　ユビキタスによる食農情報提供技術の開発 …… 37
1　農業情報のユビキタス化に関する研究 …… 37
2　流通・食品産業における IC タグ利用技術の開発 …… 39
3　農産物直売所における情報活用技術の開発 …… 41

第2章　農産物の品種判別技術の開発 …… 43
1　米加工製品における品種・産地判別 …… 43
2　コンニャクの品種判別技術の開発 …… 46
3　コンニャク加工製品における品種判別の検証 …… 48
4　小麦加工製品の品種判別技術の開発 …… 51
5　小麦粉及び麺における品種判別の検証 …… 53
6　大麦・裸麦加工製品における品種判別の検証 …… 57
7　大麦・裸麦加工製品における品種判別技術のマニュアル化と実証 …… 59
8　アズキにおける SSR マーカーの開発 …… 62
9　豆類加工製品における品種判別の検証 …… 65
10　ネギの品種判別法の開発 …… 69
11　SSR マーカによる低 DNA 多型頻度野菜の品種識別技術の開発 …… 72
12　野菜類加工製品における品種判別の検証 …… 76
13　窒素安定同位体比の解析による有機農産物の判別技術の開発 …… 80
14　果実加工製品における品種判別の検証 …… 85
15　モモ加工製品における品種判別の検証 …… 88
16　カンキツ加工製品における品種判別の検証 …… 92
17　果実加工製品における品種判別のマニュアル化と実証 …… 95
18　キノコ類の系統判別法の検証 …… 97
19　レトロトランスポゾン・マーカーによる豆類加工品品種判別技術の開発 …… 104

第3章　畜産物品種・個体判別技術の開発 …… 110
1　ウシ品種識別技術の開発 …… 110
2　市場におけるウシ品種推定法の有効性の検証 …… 113
3　安価で簡便なウシ個体識別技術の開発 …… 117
4　毛色遺伝子を利用したブタ品種識別技術の開発 …… 121
5　品種・個別識別に有用な DNA マーカーの開発 …… 125
6　ブタ有用 DNA マーカーのデータベースの構築 …… 128
7　日本短角種の全個体認証システムの構築 …… 132
8　ニワトリ品種特異的核ゲノムマーカーの開発 …… 136
9　ニワトリミトコンドリア DNA の品種間・品種内での多型解析 …… 138
10　国内特産鶏成立の遺伝的背景の解明 …… 141

11　市場鶏肉の識別技術の開発 …… 145

第 4 章　食品の生産・流通履歴の迅速検証技術の開発 …… 151
1　非破壊分析による魚介類の凍結履歴の判別技術の開発 …… 151
2　脂質等の生体成分による養殖魚判別技術の開発 …… 154
3　化学分析法による放射線照射肉類の検出 …… 158
4　近赤外分光法を用いた残留農薬簡易迅速測定システムの開発 …… 161

第 2 編　食品の安全性に関するリスク分析確立のための研究開発 …… 164
第 1 章　最近判明したリスクの解明と制御およびコミュニケーション …… 164
1　食品中のアクリルアミド分析法の改良とその応用 …… 164
2　バレイショ加工時のアクリルアミド生成に関わる要因 …… 167
3　茶及びその浸出液に含まれるアクリルアミド含有量の把握とその生成要因 …… 171
4　スギヒラタケの致死性毒物質の解明 …… 174
5　食品の安全性に係わるリスクコミュニケーションに関する意識調査と問題点の特定 …… 178

第 2 章　食品衛生管理における有害微生物の増殖予測・検出技術の開発 …… 182
1　温度管理用微生物センサーの性能評価と応用 …… 182
2　ストレスで生存している食中毒細菌の検出方法に関する研究 …… 185
3　遺伝学的手法を用いた食品からの腸炎ビブリオ検出法の検討 …… 188
4　mRNA 定量法による食中毒菌の毒素産生・病原遺伝子発現データの
構築と食品評価システムの開発 …… 192
5　Campylobacter　高感度定量試験法の開発並びに本菌食中毒防止対策の検討 …… 196
6　ウシ初乳・牛乳中のヨーネ菌の殺菌条件の検討 …… 200
7　表面温度測定による食品中の汚染微生物増殖予測システムの開発 …… 205

第 3 章　食品衛生管理のための有害微生物制御技術の高度化 …… 209
1　農産物加害細菌の汚染・付着防止技術の開発 …… 209
2　新規食用微生物による「浅漬け」食品中の微生物制御 …… 213
3　化学・物理的処理の併用による野菜の洗浄法の開発 …… 216
4　電子線・放射線照射による畜産加工食品の殺菌技術の開発と評価 …… 220
5　予測微生物的解析を用いた物理化学的処理および微生物制御技術の開発 …… 222
6　予測微生物学的解析を用いた超高圧殺菌技術の開発 …… 227
7　乳頭保護シール施用技術の開発 …… 231
8　バイオフィルム分解酵素による食中毒菌除去法の開発 …… 235
9　予測微生物学的解析を用いた食品加工機器表面における微生物制御技術の開発 …… 236
10　食品とその製造環境の殺菌における細菌死滅のデーターベース化および
グローバル予測理論の構築とその応用 …… 240

第 4 章　天然毒素等の汚染実態調査及び検出技術の高度化 …… 245
1　穀類及びその加工品の安全・信頼確保のためのオクラトキシン汚染実態の調査 …… 245
2　飼料および血液中オクラトキシン A 分析法の開発と汚染実態調査 …… 247
3　リンゴにおけるパツリン生産菌の発生実態調査および防除技術の開発 …… 251

4　パツリン産生菌のマイコトキシン産生能に及ぼすリンゴ品種の影響と汚染実態調査 …… 256
5　国産リンゴ及び各種果物のパツリン等のカビ毒汚染に関する研究 …… 259
6　穀類に含まれるフモニシン類の測定技術の開発 …… 264
7　マイコトキシンの分析法の開発と汚染防止技術の開発 …… 266
8　穀類のマイコトキシン汚染の網羅的モニタリング技術の開発 …… 270
9　アフラトキシン生産防御法の開発 …… 272
10　ニバレノールによる造血系機能の低下機構の解明 …… 276
11　豚のモデル系を用いたデオキシニバレノールが免疫系に与える影響の解析 …… 279

第5章　栽培技術等による赤かび病かび毒のリスク低減技術の開発 …… 282
1　ムギ類赤かび病関連フザリウム属菌の分子系統学的解析と同定用プライマーの開発 …… 282
2　赤かび病菌マイコトキシン不活性化・解毒遺伝子の穀類における発現と産生抑制技術の開発 …… 285
3　赤かび毒素の遺伝子定量法の開発 …… 288
4　赤かび病菌の質に関する全国サーベイシステムの確立 …… 291
5　栽培技術等による赤かび病かび毒のリスク低減技術の開発 …… 295
6　北海道での小麦赤かび病激発時におけるマイコトキシン汚染リスク低減技術の開発 …… 298
7　北日本における穀類赤かび病の発生実態および発病機構の解明 …… 302
8　東日本におけるコムギ赤かび病のかび毒汚染リスク低減化技術の開発 …… 307
9　東海地方における麦類のマイコトキシン汚染防止技術の開発 …… 312
10　西日本における赤かび病菌の個体群動態の解明と生態的制御技術の開発 …… 316
11　西日本における穀類赤かび病かび毒汚染リスク低減に有効な薬剤防除技術の開発 …… 320
12　コムギ赤かび病発生予測情報システムの開発 …… 324
13　赤かび病菌のマイコトキシン産生抑制型品種の探索と利用技術の開発 …… 326
14　マイコトキシン生産菌の環境動態に及ぼす特異作用点阻害型殺菌剤の影響解明 …… 329
15　北海道における主要小麦品種の赤かび病抵抗性発現と
　マイコトキシン産生性との相互作用の解明 …… 334
16　麦類における赤かび病かび毒蓄積様式の解明 …… 337

第3編　世界的に信頼される分析データ提供システム等の基盤構築 …… 342
第1章　国際基準に則った食品の安全性保証システムの構築 …… 342
1　かび毒分析法における分析精度とその要因に関する検討 …… 342
2　マイコトキシン分析の信頼性確保のための外部精度管理調査システムの開発 …… 346
3　国際データ共有によるカンピロバクター食中毒菌の迅速検知・種同定システムの開発 …… 349
4　腸管上皮細胞を用いた有害物質の腸管透過性評価技術の開発とその応用 …… 351
5　作物における重金属元素等の動態解析と制御 …… 355
6　魚介類中のカドミウムおよび水銀の濃度現状把握、分析手法の確立、および存在形態の解明 …… 360
7　食品中に含まれる鉛等重金属の実態解明 …… 364
8　米同一品種の DNA 解析による産地判別 …… 367
9　米の DNA 品種判別法の試験室間共同試験による妥当性確認 …… 372
10　イチゴ DNA 品種識別法の開発と試験室間共同試験による妥当性確認 …… 376
11　X 線分析を用いたコメ及び栽培土壌の成分分析技術の開発 …… 380

研　究　の　要　約

Ⅰ　研究年次・予算区分

研究年次：2002年度～2005年度

予算区分：農林水産省農林水産技術会議 食品の安全性及び機能性に関する総合研究

Ⅱ　主任研究者

主　査：(独)食品総合研究所
理事長
鈴木　建夫（2002～2003年度）
春見　隆文（2004年度）
児玉　徹　（2005年度）

副主査：(独)食品総合研究所
食品機能部長
篠原　和毅（2002年度）
津志田藤二郎（2003～2005年度）

推進リーダー：(独)食品総合研究所
流通安全部長
永田忠博（2002～2005年度）

サブリーダー（ユビキタスによる食農情報提供技術の開発）：
(独)食品総合研究所
食品工学部　電磁波情報工学研究室長
杉山　純一（2002～2005年度）

サブリーダー（農産物の品種判別技術の開発）：
(独)農業技術研究機構　近畿中国四国農業研究センター
作物開発部　育種工学研究室長
矢野　博　（2003～2005年度）

サブリーダー(畜産物品種・個体判別技術の開発)：
(独)農業生物資源研究所
発生分化研究グループ長
居在家義昭　（2003～2005年度）

サブリーダー(食品の生産・流通履歴の迅速検証技術の開発)：
(独)食品総合研究所
分析科学部　非破壊評価研究室長
河野澄夫（2003～2005年度）

サブリーダー（最近判明したリスクの解明と制御およびコミュニケーション)：
(独)食品総合研究所
分析科学部　状態分析研究室長
吉田　充（2003～2005年度）

サブリーダー（食品衛生管理における有害微生物の増殖予測・検出技術の開発)：
(独)食品総合研究所
企画調整部　食品衛生対策チーム長
川本伸一（2003～2005年度）

サブリーダー（食品衛生管理のための有害微生物制御技術の高度化)：
(独)食品総合研究所
食品工学部　製造工学研究室長
五十部誠一郎（2003～2005年度）

サブリーダー（天然毒素等の汚染実態調査及び検出技術の高度化)：
(独)農業技術研究機構　動物衛生研究所
安全性研究部長
宮崎　茂（2003～2005年度）

サブリーダー（栽培技術等による赤かび病かび毒のリスク低減技術の開発)：
(独)農業技術研究機構　中央農業総合研究センター
病害防除部　糸状菌病研究室長
小泉　信三（2003～2005年度）

サブリーダー（国際基準に則った食品の安全性保証システムの構築)：
(独)食品総合研究所
流通安全部　安全性評価研究室長
後藤　哲久（2002～2003年度）
分析科学部長
安井　明美（2004～2005年度）

Ⅲ　研究担当機関

独立行政法人食品総合研究所（現　独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構）
（委託先）国立大学法人東京大学
（委託先）国立大学法人静岡大学
（委託先）国立大学法人東京海洋大学
（委託先）国立大学法人信州大学
（委託先）国立大学法人九州大学

（委託先）国立大学法人お茶の水女子大学
（委託先）学校法人関西大学
（委託先）財団法人日本穀物検定協会
（委託先）財団法人食品薬品安全センター
（委託先）東京都健康安全研究センター

独立行政法人農業生物資源研究所
（委託先）国立大学法人神戸大学
（委託先）国立大学法人広島大学
（委託先）群馬県農業技術センター
（委託先）岩手県農業研究センター
（委託先）社団法人 畜産技術協会
（委託先）社団法人 農林水産先端技術産業振興センター

独立行政法人農業技術研究機構（現　独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構）
（委託先）国立大学法人岡山大学
（委託先）国立大学法人岐阜大学
（委託先）秋田県立大学
（委託先）香川県農業試験場
（委託先）愛媛県農業試験場
（委託先）北海道立中央農業試験場
（委託先）大阪府食とみどりセンター
（委託先）福島県果樹試験場
（委託先）愛知県農業総合試験場
（委託先）株式会社サタケ

独立行政法人森林総合研究所

独立行政法人水産総合研究センター

独立行政法人種苗管理センター

Ⅳ　研究目的

全体

BSE(牛海綿状脳症)問題、食品の偽装表示問題等、「食」と「農」に関する様々な問題が顕在化し、一般消費者の食品に対する信頼を急速に失わせるなど社会的に大きな問題となっている。このような中、農場から食卓までのフードチェーン全体を通した安全性の確保が課題となっており、科学的根拠に基づくリスク分析の原則に従った対応が必要とされている。

このため、リスク低減のための殺菌・流通技術及び危害検知技術の開発など食品の安全性に関するリスク分析に係る技術開発、食品の表示や履歴について科学的裏付けを確保する技術開発を行うとともに、信頼度の高い分析データ提供システムの基盤を構築する。

さらに、少子高齢化社会を迎えた我が国において健康で活力に満ちた質の高い生活を確保し、活力ある長寿生活を実現するため、食品機能性や食品素材の組合せによる効果の解明、流通・加工過程における食品の機能性成分の維持・増強技術の開発等により、生活習慣病を予防するための健全な食生活構築に資する。

1　トレーサビリティ・品質表示の裏付けとなる研究開発

(1) ユビキタスによる食農情報提供技術の開発

生産情報公表 JAS にも対応した XML ベースの農産物データベースを開発するとともに、そこに蓄積されているデータを再利用して、独自デザインのホームページを自社サイトから公開できる技術を開発する。さらに、これらの生産情報の偽証を防止する技術、および、品質等の情報も合わせて公開できる技術開発を行う。また、末端の流通店舗等にて、IC タグを利用して公開的に情報を公開できる技術および POS と連携したシステムを開発する。

(2) 農産物の品種判別技術の開発

トレーサビリティ・食品表示についての科学的な裏付けとなる、野菜・果実類等各種農産物の品種判別及び原産地判別技術等を正確に判別する技術を開発する。また、有機農産物の判別については、窒素安定同位体比の解析に基づく技術を開発する。

(3) 畜産物品種・個体判別技術の開発

わが国における牛海綿状脳症（BSE）の発生、それにともなう偽装牛肉事件や偽黒豚肉流通などを契機に、食肉を対象としたトレーサビリティシステム導入や表示制度の適正化が推進されてきていている。これらのシステムや制度を厳格に運用するため、DNA マーカーを用いた品種や個体識別等の技術が有効であり、各種の農産物等で開発が行われている。

本中課題は、主要な家畜であるウシ、ブタおよびニワトリについて、DNA マーカーを用いた品種、交雑種（系統）および個体等の識別技術を開発し、流通現場への導入の可能性を検証することを目的としている。

(4) 食品の生産・流通履歴の迅速検証技術の開発

魚介類の凍結履歴の判定技術、養殖魚判別技術、放射線照射肉類の検出技術及び残留農薬簡易迅速測定システムを開発する。

2　食品の安全性に関するリスク分析確立のための研究開発

(1) 最近判明したリスクの解明と制御およびコミュニケーション

アクリルアミドに関しては、反応機構の解明、低減化技術の開発、家庭内調理や工場における品質管理など、多様な研究目的に対して適用できる分析技術を開発し、提供する。アクリルアミド生成には食材中の還元糖とアスパラギンが関与するとされているが、バレイショの品種や貯蔵条件で糖やアミノ酸量は様々に推移すると考えられる。そこで、その成分の量変化を制御することで日本におけるポテトチップ等バレイショ加工品のアクリルアミド低減を図る方法を考案する。茶類も製造工程で加熱を伴うので、日本産各種茶を収集し、アクリルアミド含量の実態と生成機構を解明し､低減化技術を開発する。

日本中に自生するスギヒラタケについては、長年にわたり広く食されてきたにもかかわらず、最近、主に腎障害のある人に急性脳症を引き起こす可能性が指摘されている。そこで、このキノコから致死性毒物質の単離を試みるとともに、急性脳症との関連や作用機構を明らかにし、毒性を有するスギヒラタケの判別技術の開発や、毒性が低減されたスギヒラタケの育種・栽培技術の開発等に資する。

なお、日本で最近起きた様々な食品の安全性にかかわる事件では、リスクコミュニケーションの失敗により、消費者の政府や生産者・製造者に対する信頼の低下や、販売量の減少が見られた。そこで、より良いリスクコミュニケーションを行うための情報の収集や手法の開発を試みる。

(2) 食品衛生管理における有害微生物の増殖予測・検出技術の開発

食品の微生物学的安全性確保を目的として、有害微生物に関する簡易・迅速な検出技術および制御方法確立のための増殖予測技術の開発を行う。具体的には、①生鮮食品などの低温流通における有害微生物の増殖リスクを低減するための温度管理異常をいち早く警告可能な安全・簡便な微生物温度センサーの開発②時間を要する従来の培養法に代わる高感度・迅速な腸炎ビブリオ検出技術の開発③野外での接種実験を可能とする非病原性のビブリオ指標細菌の探索と低温や高浸透圧などのストレスを受けた腸炎ビブリオの損傷菌増殖法の開発④動物試験によらない遺伝子手法によるボツリヌスリスク評価システムおよび腸炎ビブリオ株胃酸耐性度の迅速評価法の開発⑤食中毒菌 *Campylobacter jejuni/coli* に関して、現行の公定法に代わる高精度で迅速・簡易に同定検出および定量可能な検査システムの開発⑥ウシに慢性下痢性伝染病を引き起こすヨーネ病菌について、牛乳中のヨーネ菌の簡易・迅速な検出技術および殺菌法の開発⑦表面温度から食品全体における微生物増殖を推定するシステムの開発を目的とする。

(3) 食品衛生管理のための有害微生物制御技術の高度化

農畜産物の安全性を確保するための微生物汚染防止技術（微生物制御技術）を開発する。特に食品製造工程において懸案となっている野菜などの生鮮物に対応した効果的な微生物制御技術や処理により品質劣化を生じにくい高品質の微生物制御技術について、基礎的な微生物制御方法として有効と思われる技術を抽出して、想定される食品の生産加工工程において実用化することを前提とした研究開発を実施することを基本としている。

(4) 天然毒素等の汚染実態調査及び検出技術の高度化

食品を汚染する可能性のある各種のマイコトキシン（カビ毒）については、ヒトへの健康影響を防ぐために、コーデックス委員会等での実量規制作業が順次進められている。

本チームでは、これらのマイコトキシンのリスク分析のため、オクラトキシン A、パツリン、シトリニン、フモニシン、ステリグマトシスチン等の分析

法を確立するとともに、その汚染実態を調査する。

また、マイコトキシンの生体影響（毒性）を明らかにするため、培養細胞および動物を用いて、トリコテセンの毒性作用の解析を行う。

さらに、生産・流通段階でのマイコトキシン汚染を防ぐため、リンゴでの青カビ病の発生を防除する方法の開発およびアフラトキシン産生防御法の開発も行う。

(5) 栽培技術等による赤かび病かび毒のリスク低減技術の開発

ムギ類に発生する赤かび病は収量・品質の低下のみならず人畜に有害なかび毒汚染を起こし、麦類の生産安定と食品の安全性を阻害する重要なハザードとなっている。このため、赤かび病菌の特性を解明するとともに、発病とかび毒汚染リスクを低減する効果的な生産管理手法を開発する。

3　世界的に信頼される分析データ提供システム等の基盤構築

(1) 国際基準に則った食品の安全性保証システムの構築

世界基準の試験所の要件は、例えば、国際食品規格委員会（Codex Alimentarius Commission）の食品の輸出入に係わる試験所に対するガイドラインでは、①ISO/IEC 17025の要求事項を満たしていること、②適切なプロフィシエンシィテスティングに参加していること、③妥当性が確認された方法を用いていること、④内部品質管理を行っていること、を挙げている。ここでは、分析の信頼性確保のために、試験室間共同試験による分析法の妥当性確認を中心に、技能試験の実施、分析法の異なるマトリックスへの適用拡大、新しい分析法の開発と実態解明を行う。

Ⅴ　研究方法

1　トレーサビリティ・品質表示の裏付けとなる研究開発

(1) ユビキタスによる食農情報提供技術の開発

農産物流通における情報インフラとして、オープン&フリーの農産物データベース（青果ネットカタログーSEICA）を開発するとともに、そこに蓄積されているデータを再利用して、独自の情報開示や信頼性チェックのシステムを構築できるシステムを開発する。さらに、生産情報公表 JAS に対応した詳細な生産履歴情報を記録できるデータベース、消費者からの要望が強いレシピに関しても独立したデータベースを開発する。これらのデータベースが必要に応じてお互いに連携して協調動作できるように設計し、実際に実証試験を通じてその効果測定を行う。また、POS においても、これらの生産情報が活用できるように、まずは小規模な直売所を対象にして、販売管理・入出荷管理・情報公開ができるっようなシステムを開発する。

(2) 農産物の品種判別技術の開発

米については、米飯、発芽玄米、日本酒等の加工製品からの DNA 抽出・精製技術と品種・産地判別技術を開発した。コンニャクについては、制限酵素ランドマークゲノムスキャニング（RLGS）法を用いて、品種判別のための遺伝子型プロファイルの作成と STS 化した品種判別マーカーを開発した。小麦については、市販のクラッカー、パン、うどん等の加工製品からの DNA 抽出法の開発と SSR マーカーの開発を行った。大麦・裸麦については、味噌、麦茶等の加工製品由来の DNA を対象に、SSR マーカーによる品種判別の検証を行った。アズキについては SSR マーカーを用いて、北海道育成品種と海外産豆類との品種識別法を確立し、冷凍ゆでアズキや加糖餡等における品種判別手法を開発した。ネギについては育成段階において、品種内で高い品種内 DNA 多型を保持・固定した個体を選抜する「品種標識法」を提案し、他品種との識別が可能な品種育成法を実証した。また、ナスを対象とした SSR マーカーを用いた系統間及び系統内多型を調査し、SSR マーカーによる低 DNA 多型頻度野菜の品種識別技術法確立のための基礎情報を得た。これらの情報を基に、野菜類加工製品であるナス漬けとキムチを対象に、ナスとハクサイの SSR マーカー及びニンニクの STS マーカーによる品種判別の他、キムチ漬け液中の乳酸菌叢 DNA 分析による原産地判別技術を開発した。果実については、モモ、ナシ、リンゴで開発した SSR マーカーを用いて、ナシ、モモ、リンゴ、オウトウ、スモモ、ウメ、アンズ、ビワの品種判別を行い、乾燥果実、缶詰、ジュース等の果実加工品における品種判別の検証を行った。また、カンキツについては CAPS マーカーを用いて、果実及びジャム、マーマ

レード、ドライフルーツ等の加工製品に適した品種判別法の開発と検証を行った。また、これら果実加工製品における品種鑑定用マニュアルの作成と実証を行った。シイタケについては品種判別指標として、DNA Data Bank of Japan（DDBJ）に登録したIGS1-DNA シーケンスとの照合が実用的な系統判別法であることを検証した。また、転移性のレトロトランスポゾンを用いて、品種がブレンドされたアズキ加工製品においても識別が可能な品種固有のDNA マーカーの開発に取り組んだ。有機農産物の判別技術については δ^{15}N値の分析によりその農産物が、無化学肥料で栽培されたかどうか判別する技術を開発した。

(3) 畜産物品種・個体判別技術の開発

ウシについては、国内産牛肉の品種識別、豪州産輸入牛肉と国産牛肉の識別、簡便で精度の高い個体識別ができる DNA マーカーのセットを開発する。また、開発された国内産牛識別のための DNA マーカーを用いた判別方法について、流通現場での活用について検討する。ブタについては、EST 解析によって作成されたデータベースを利用し、SNPs を抽出するとともに、品種・個体における SNPs の分布及び頻度を検出、あるいは、網羅的に毛色関連遺伝子の配列を解析することにより、様々な品種・系統・個体の識別に対応できるデータベースの構築や DNA マーカーの開発を行う。ニワトリについては AFLP 等を用いた核ゲノムの多型解析、日本鶏ならびに外国由来商用鶏品種のマイクロサテライト DNA マーカーにおけるアリル頻度、名古屋コーチンおよび比内地鶏と他の鶏を識別できるマイクロサテライト DNA マーカーの選択やミトコンドリア DNA の多型解析から国内特産鶏の識別および品種識別法を開発する。

(4) 食品の生産・流通履歴の迅速検証技術の開発

魚介類の凍結履歴の判定技術の開発では近赤外分光法を応用する。養殖魚判別技術の開発では脂肪等の生体成分情報を活用する。放射線照射肉類の検出技術の開発では放射線による成分の変質を活用する。残留農薬簡易迅速測定システムの開発では近赤外分光法と DESIR 法を併用する方法を応用する。

2　食品の安全性に関するリスク分析確立のための研究開発

(1) 最近判明したリスクの解明と制御およびコミュニケーション

少量試料で多検体を迅速に分析するためにアクリルアミド分析法の最適化を行った。さらに、本法の信頼性を確保するため、外部精度管理（技能試験、proficiency test）に参加した。品種や貯蔵条件の異なるバレイショについて、揚げ加工前のアミノ酸含量、還元糖含量と、スライスして180℃ 90～95秒間の揚げ加工後のアクリルアミド含量を分析し、両者の関係についての解析を行った。

日本産各種茶を収集し、茶及びその浸出液中のアクリルアミド含有量の調査を行った。焙煎温度、焙煎時間を変えて製造した焙じ茶のアクリルアミドを分析し、焙煎条件がアクリルアミドの生成に及ぼす影響を調べた。また、原料茶葉のアミノ酸及び糖の組成が焙煎後のアクリルアミド含量に及ぼす影響を重回帰分析を用いて解析した。さらに、生葉の貯蔵が焙煎後のアクリルアミド含量に及ぼす影響を調べた。

スギヒラタケについては、凍結乾燥試料を破砕し、ヘキサン、酢酸エチル、エタノール、水、熱水で順次抽出し、各抽出画分を、マウスの腹腔内、あるいは静脈内に投与し、毒性の有無を確認した。致死活性と他の活性（目の充血や痙攣）を指標に、各種クロマトグラフィーを駆使して毒本体の単離を試みた。また、種々のクロマトグラフィーを駆使してレクチンを単離・精製し、毒性を検討した。

リスクコミュニケーションに関しては、2001年～2003年秋に2000～3000人規模の意識調査を郵送法により実施し、結果を統計解析した。その調査時に募った自主的な調査協力者252名を対象に、2004年秋、内容的に踏み込んだ調査を実施し、各「ハザード」の「リスク特性」について7点尺度で回答を求めた結果を、因子分析に基づき、Slovic のサイコメトリック・アプローチを用いて解析した。

(2) 食品衛生管理における有害微生物の増殖予測・検出技術の開発

微生物センサーに関しては、安全な食品微生物パン酵母の発酵能に着目した検討を行なった。食中毒菌（腸炎ビブリオ・*Campylobacter jejuni/coli*）やヨー

ネ病菌の簡便迅速検出技術並びにボツリヌスリスク評価システム開発においては、遺伝子増幅手法等の分子生物学的および生化学的手法の検討を行った。食品における微生物増殖推定システムの開発においては、最新の予測微生物学手法を検討した。

(3) 食品衛生管理のための有害微生物制御技術の高度化

微生物制御技術の検討は、2つに分けられ、1つめは、微生物付着防止技術に関してであり、野菜等の農産物表面、搾乳牛の乳房、食品加工装置などの表面を対象として有害微生物の付着防止技術について開発を行う。2つめは、微生物・バイオフィルムなどの除去・殺菌技術に関してであり、殺菌処理として天然抗菌剤、化学薬剤、放射線照射及び低エネルギー電子線照射、交流高電界、電解酸性水・電解オゾン水、超高圧、バイオフィルムの酵素分解、加熱及び薬剤などの殺菌処理の開発を行う。これらの開発においては、それぞれの制御方法の効果の評価や最適化条件を検証する。さらに一部の課題については、予測微生物学を利用した検討や殺菌条件などのデータベース化の検討を行う。

(4) 天然毒素等の汚染実態調査及び検出技術の高度化

マイコトキシンのリスク管理に資するため、最新の分析技術を応用した各種マイコトキシンの分析法の開発・高度化のための検討を行うとともに、開発した方法を用いた汚染実態調査も行う。

また、マイコトキシンの生体影響を明らかにするため、トリコテセンマイコトキシンの毒性作用の解析を、*in vitro* および感受性の高いブタを用いた *in vivo* レベルで解析する。

生産・流通段階でのマイコトキシン汚染を防ぐ試みでは、リンゴの保存法等を検討して、リンゴの青カビ病発生を防除する方法の開発を試みる。また、アフラトキシンの産生メカニズム解析をもとに、アフラトキシンの産生を抑制する方法の開発を試みる。

(5) 栽培技術等による赤かび病かび毒のリスク低減技術の開発

赤かび病関連フザリウム属菌の分子系統学的解析に基づいた新たな分類体系に対応する同定用プライマーを開発する。赤かび病菌のかび毒を不活性化・解毒遺伝子をモデル植物のイネに導入し穀類における発現を解析する。定量 PCR 法を用いて赤かび毒素の生合成関連遺伝子を検出し、病徴や毒素蓄積量の低減化に寄与することができるかどうか調査する。全国に分布する赤かび病菌を遺伝子解析し、分子系統学的な種の同定と毒素産生型の分布を調査する。小麦の調製加工工程において、正常粒から赤かび病汚染粒を除去するための色彩選別技術及びかび毒濃度が高いフスマ部分を除去する精麦技術を開発する。北海道において、赤かび病防除薬剤のかび毒低減効果の査定、散布回数、散布時期を検討する。北日本におけるイネ赤かび病の発生実態と原因菌の同定および感染機構を解明する。東日本地域における薬剤防除技術の開発と赤かび病菌のコムギ穂への感染時期と被害程度・かび毒蓄積量との関係について検討する。東海地域における防除技術について耕種的防除を主眼にして検討する。自然発病圃場よりサンプリングしたムギ類赤かび病菌個体群の多様性と分布様式を調査し、時間の経過とともにその分布様式がどのように変動するかを検討する。赤かび病防除薬剤の耐雨性を人工降雨実験施設を用いて検討する。赤かび病の感染好適気象条件をモデル化した上で、アメダス等の気象データ、ならびにコムギの出穂期予測モデルを改良して組み合わせ、赤かび病の発生程度を予測するモデルの開発を行う。コムギ品種の抵抗性の発現機構とかび毒産生様式との関係を検討するとともに、かび毒産生抑制型品種を探索する。ベンゾイミダゾール系やストロビルリン系などの特異作用点阻害型殺菌剤の使用が、圃場環境における Fusarium 属菌の動態に及ぼす影響を分子疫学的手法などにより解析する。北海道産主要小麦品種の赤かび病抵抗性反応およびかび毒産生と抵抗性発現の相互作用について解明する。赤かび病菌の感染時期と穀粒中かび毒蓄積量との関係および登熟期間中のかび毒蓄積様式を検討する。西日本においては、NIV 産生型菌株が優占して分布することから、試験研究用の NIV 産生型菌株を新たに選定する。

3　世界的に信頼される分析データ提供システム等の基盤構築

(1) 国際基準に則った食品の安全性保証システムの

構築

1)①マイコトキシン分析における方法と真度の変化、②ルブラトキシンBをモデルとしての酵素抗体法とHPLC法との比較、③ムギ中のオクラトキシンA分析法のコメへの適用拡大を検討した。

2)①外部精度管理調査、②検査方法等に関する調査、③評価方法の検討を行った。

3)①供試菌株の収集および核酸抽出、②収集菌株の特異的遺伝子配列の決定、③多重配列解析および系統樹解析、④遺伝子手法による簡易迅速同定技術の開発を行った。

4)①腸管上皮細胞の培養、②腸管上皮細胞層の透過試験、③カドミウムに対する腸管上皮細胞の応答の *in vitro* 解析、④カドミウムに対するマウス腸管の応答の *in vivo* 解析を行った。

5)①ダイズの品種による Cd 蓄積濃度の調査、②放射化分析法、ICP-AESなどによる元素分析を行い各手法における検出感度の差の検討、③ポット試験(土耕栽培)による種子形成後の植物の葉、茎、さや、種子の放射化分析、④他元素による Cd 障害緩和作用の検討、⑤Cdの放射性トレーサー^{109}Cdを用いた、pH4.5および pH6.5の水耕液からダイズに吸収される Cd の蓄積分布の調査、⑥ポジトロン放出核種である^{15}Oで標識した水とイメージングプレートによる Cd 処理を行った植物の地上部への水動態の解析を行った。

6)①魚介類に含まれる総水銀、メチル水銀およびカドミウムの現状把握、②ICP-MS によるカドミウム分析システムの構築、③魚肉中の水銀結合性タンパク質の精製を行った。

7)①誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)の組成認証標準物質による分析法の妥当性確認、外部精度管理事業へ参加、共存元素の誘導結合プラズマ発光分析法（ICP-AES）による多元素同時測定、テフロン密閉式容器を用いるマイクロ波湿式分解による測定用試料溶液調製法の検討、②妥当性確認した方法による市販乳幼児用食品の測定を行った。経口暴露評価には、農林水産省が実施した「農産物等に含まれる鉛の調査」のデータも活用した。

8)①理化学的フィンガープリント、②同一品種の原種同士の DNA 塩基配列の相違に基づく PCR 法、③同一品種の同質遺伝子系統の DNA 塩基配列の相違に基づく PCR 法を検討した。

9)①PCR 用の有用プライマーの開発、②新潟コシヒカリ BL の識別用マーカーの開発、③プライマーセットの開発と試験室間共同試験を行った。

10)①イチゴの高次倍数性を考慮した DNA マーカーの明瞭化と簡易化と国内主要品種の DNA 多型データベースの作成、および識別精度の算出、②識別技術のマニュアル化および研究室間共同試験を行った。

11)①有機JAS認証野菜と通常栽培野菜のδ^{15}N値の比較、②各地で生産された有機、無機栽培野菜のδ^{15}N値の比較、③イチゴのδ^{15}N値に及ぼす肥料および土壌窒素の影響、④トマトのδ^{15}N 値に及ぼす肥料および土壌窒素の影響についての各地での比較試験を行った。

12)①エネルギー分散型蛍光X線分析(XRF-EDS)、波長分散型蛍光X線分析(XRF-WDS)、エネルギー分散型分析走査電子顕微鏡(SEM-EDS)、X線回折分析（XRD）等による各種元素分析・観察、②高濃度の重金属を含有させた土壌でポット栽培したコシヒカリの収穫後のコメ粒を玄米、糠、胚芽、胚乳に分別後分析、③各種元素濃集部位を特定するため、圃場で開花後からコメの結実に至るまでのコメ試料を採取し、SEM-EDSによる時系列分析及び観察を行った。

研究計画表（研究室別年次計画）

研究課題	研究年度				担当研究機関・研究室	
	02	3	4	5	機関	研究室
1　トレーサビリティ・品質表示の裏付けとなる研究開発						
(1) ユビキタスによる食農情報提供技術の開発						
1　農業情報のユビキタス化に関する研究	←	—	—	→	食品総合研究所	電磁波情報工学研究室
2　流通・食品産業における IC タグ利用技術の開発				↔	筑波大学	食料プロセス工学研究室
				↔	東京大学大学院	農学生命科学研究科
3　農産物直売所における情報活用技術の開発						
(2) 農産物の品種判別技術の開発						
1　米加工製品における品種・産地判別				↔	食品総合研究所	穀類特性研究室
2　コンニャクの品種判別技術の開発				↔	農業生物資源研究所	遺伝子修飾研究チーム
3　コンニャク加工製品における品種判別の検証		←	—	→	群馬県農業技術センター	こんにゃく特産研究センター
4　小麦類加工製品の品種判別の開発		←	—	→	近畿中国四国農業研究センター	育種工学研究室
5　小麦粉及び麺における品種判別の検証		←	—	→	香川県農業試験場	生物工学担当
6　大麦・裸麦加工製品における品種判別の検証		←	—	→	近畿中国四国農業研究センター	裸麦育種研究室
7　大麦・裸麦加工製品における品種判別技術のマニュアル化と実証		←	—	→	愛媛県農業試験場	作物育種室
8　アズキにおける SSR マーカーの 開発		←	—	→	農業生物資源研究所	集団動態研究チーム
9　豆類加工製品における品種判別の検証		←	—	→	北海道立中央農業試験場	農産工学部
10　ネギの品種判別法の開発		←	→		野菜茶業研究所	ユリ科育種研究室
11　SSR マーカーによる低 DNA 多型頻度野菜の品種識別技術の開発		←	→		野菜茶業研究所	育種工学研究室
12　野菜類加工製品における品種判別の検証		←	—	→	大阪府立食とみどりの総合技術センター	
13　窒素安定同位体比の解析による有機農産物の判別技術の開発		←	→		野菜茶業研究所	環境制御研究室
14　果実加工製品における品種判別の検証		←	—	→	果樹研究所	遺伝育種部
15　モモ加工製品における品種判別の検証		←	—	→	福島県果樹試験場	育種研究室
16　カンキツ加工製品における品種判別の検証		←	—	→	果樹研究所	カンキツ研究部
17　果実加工製品における品種判別のマニュアル化と実証				↔	種苗管理センター	研究開発課
18 キノコ類の系統判別の検証		←	—	→	森林総合研究所	きのこ研究室
19 レトロトランスポゾン・マーカーによる豆類加工品品種判別技術の開発				↔	岡山大学	資源細胞工学研究室
(3) 畜産物品種・個体判別技術の開発						
1　ウシ品種識別技術の開発		←	—	→	神戸大学	応用動物遺伝学講座
2　市場におけるウシ品種推定法の有効性の検証		←	—	→	農林水産消費技術センター/畜産技術協会附属動物鑑定課	
3　安価で簡便なウシ個体識別技術の開発		←	—	→	遺伝研究所	動物遺伝研究部
4　毛色遺伝子を利用したブタ品種識別技術の開発		←	—	→	STAFF 研究所	研究部第 2 部
5　品種・個別識別に有用な DNA マーカーの開発		←	—	→	STAFF 研究所	研究部第 2 部
6　ブタ有用 DNA マーカーのデータベースの構築		←	—	→	農業生物資源研究所	家畜ゲノム研究チーム
7　日本短角種の全個体認証システムの構築		←	—	→	岩手県農業研究センター	家畜工学研究室
8　ニワトリ品種特異的核ゲノムマーカーの開発		←	—	→	農業生物資源研究所	動物遺伝子機能研究チーム
9　ニワトリミトコンドリア DNA の品種間・品種内での多型解析		←	—	→	農業生物資源研究所	発生制御研究チーム
10　国内特産鶏成立の遺伝的背景の解明		←	—	→	広島大学大学院	家畜育種遺伝学研究室
11　市場鶏肉の識別技術の開発				↔	農業生物資源研究所	動物資源研究チーム
(4) 食品の生産・流通履歴の迅速検証技術の開発						
1　非破壊分析による魚介類の凍結履歴の判別技術の開発		←	—	→	水産総合研究センター	品質管理研究室
2　脂質等の生体成分による養殖魚判別技術の開発				↔	水産総合研究センター	素材開発研究室
3　化学分析法による放射線照射肉類の検出		←	—	→	食品総合研究所	電磁波情報工学研究室
4　近赤外分光を用いた残留農薬簡易迅速測定システムの開発		←	—	→	食品総合研究所	非破壊評価研究室
2　食品の安全性に関するリスク分析確立のための研究開発						
(1) 最近判明したリスクの解明と制御およびコミュニケーション						
1　食品中のアクリルアミド分析法の改良とその応用		←	—	→	食品総合研究所	状態分析研究室
2　バレイショ加工時のアクリルアミド生成に関		←	→		北海道農業研究センター	ばれいしょ育種･品質制御

わる要因						チーム
3　茶及びその浸出液に含まれるアクリルアミド含有量の把握とその生成要因		←		→	野菜茶業研究室	茶品質化学研究室
4　スギヒラタケの致死性毒物質の解明				↔	静岡大学	生物資源化学講座
5　食品の安全性に係わるリスクコミュニケーションに関する意識調査と問題点の特定	←			→	食品総合研究所	研究企画科
(2) 食品衛生管理における有害微生物の増殖予測・検出技術の開発						
1　温度管理用微生物センサーの性能評価と応用		←		→	食品総合研究所	食品衛生ユニット
2　ストレスで生存している食中毒細菌の検出方法に関する研究		←		→	東京大学大学院	農学生命化学研究科
3　遺伝学的手法を用いた食品からの腸炎ビブリオ検出法の検討		←		→	東京都健康安全センター	微生物部食品微生物研究科
4　mRNA 定量法による食中毒菌の毒素産生・病原遺伝子発現データの構築と食品評価システムの開発		←		→	東京海洋大学	食品生産科学科
5　Campylobacter 高感度定量試験法の開発並びに本菌食中毒防止対策の検討		←		→	東京都健康安全センター	微生物部疫学情報室
6　ウシ初乳・牛乳中のヨーネ菌の殺菌条件の検討		←		→	農研機構 動物衛生研究所	ヨーネ病研究チーム
7　表面温度測定による食品中の汚染微生物増殖予測システムの開発		←		→	東京都健康安全センター	微生物部食品微生物研究科
(3) 食品衛生管理のための有害微生物制御技術の高度化						
1　農産物加害細菌の汚染・付着防止技術の開発	←			→	九州大学大学院	食品バイオ工学講座
2　新規食用微生物による「浅漬け」食品中の微生物制御			←	→	食品総合研究所	食品衛生対策チーム
3　化学・物理的処理の併用による野菜の洗浄法の開発		←		→	お茶の水女子大学	食品貯蔵学研究室
4　電子線･放射線照射による畜産加工食品の殺菌技術の開発と評価				↔	食品総合研究所	衛生対策チーム
5　予測微生物学的解析を用いた物理化学的処理および微生物制御技術の開発	←			→	食品総合研究所	製造工学研究室
6　予測微生物学的解析を用いた超高圧殺菌技術の開発		←		→	食品総合研究所	食品高圧技術チーム
7　乳頭保護シール施用技術の開発		←		→	畜産草地研究所	家畜管理工学研究室
8　バイオフィルム分解酵素による食中毒菌除去法の開発				↔	食品総合研究所	分子情報研究室
9　予測微生物学的解析を用いた食品加工機器表面における微生物制御技術の開発				↔	東京海洋大学	海洋食品科学科
10 食品とその製造環境の殺菌における細菌死滅のデーターベース化およびグローバル予測理論の構築とその応用		←		→	関西大学	生物制御工学研究室
(4) 天然毒素等の汚染実態調査及び検出技術の高度化						
1　穀類及びその加工品の安全・信頼確保のためのオクラトキシン汚染実態の調査	←			→	（財）日本穀物検定協会	中央研究所安全性検査研究チーム
2　飼料および血液中オクラトキシンA分析法の開発と汚染実態調査	←			→	動物衛生研究所	毒性物質制御研究室
3　リンゴにおけるパツリン生産菌の発生実態調査および防除技術の開発	←			→	果樹研究所	病害研究室
4　パツリン産生菌のマイコトキシン産生能に及ぼすリンゴ品種の影響と汚染実態調査	←			→	東北農業研究センター	品質評価研究室
5　国産リンゴ及び各種果物のパツリン等のカビ毒汚染に関する研究	←			→	東京都立衛生研究所	食品研究科･食品化学第一研究室
6　穀類に含まれるフモニシン類の測定技術の開発			←	→	食品総合研究所	微生物制御研究室
7　マイコトキシンの分析法の開発と汚染防止技術の開発	←			→	食品総合研究所	微生物制御研究室
8　穀類のマイコトキシン汚染の網羅的モニタリング技術の開発				↔	食品総合研究所	安全性評価研究室
9　アフラトキシン生産防御法の開発	←			→	食品総合研究所	細胞機能研究室
10　ニバレノールによる造血系機能の低下機構の解明				↔	食品総合研究所	安全性評価研究室
11　豚のモデル系を用いたデオキシニバレノールが免疫系に与える影響の解析				↔	動物衛生研究所	毒性病理研究室
(5) 栽培技術等による赤かび病かび毒のリスク低減技術の開発						
1　ムギ類赤かび病関連フザリウム属菌の分子系統学的解析と同定用プライマーの開発		←		→	農業生物資源研究所	生物分類研究チーム
2　赤かび病菌マイコトキシン不活性化・解毒遺伝子の穀類における発現と産生抑制技術の開発		←		→	理化学研究所	環境分子生物学研
3　赤かび毒素の遺伝子定量法の開発		←		→	神戸市環境保健研究所	食品化学部
4　赤かび病菌の質に関する全国サーベイシステ				↔	岐阜大学	ゲノム研究分野

ムの確立						
5　栽培技術等による赤かび病かび毒のリスク低減技術の開発		←		→	(株)サタケ	技術本部
6　北海道での小麦赤かび病激発時におけるマイコトキシン汚染リスク低減技術の開発		←		→	北海道立十勝農試 北海道立中央農試	病虫科
7　北日本における穀類赤かび病の発生実態および発病機構の解明		←		→	秋田県立大学	植物保護学講座
8　東日本におけるコムギ赤かび病のかび毒汚染リスク低減化技術の開発		←		→	中央農業研究センター	菌病害研究室
9　東海地方における麦類のマイコトキシン汚染防止技術の開発		←		→	愛知県農業総合試験場	環境基盤研究部病害虫グループ
10 西日本における赤かび病菌の個体群動態の解明と生態的制御技術の開発		←		→	九州沖縄農業研究センター	地域基盤部
11 西日本における穀類赤かび病かび毒汚染リスク低減に有効な薬剤防除技術の開発		←		→	九州沖縄農業研究センター	地域基盤部
12 コムギ赤かび病発生予測情報システムの開発				⇔	中央農業研究センター	モデル開発チーム
13 赤かび病菌のマイコトキシン産生抑制型品種の探索と利用技術の開発		←		→	中央農業研究センター	病害防除システム研究室
14 マイコトキシン生産菌の環境動態に及ぼす特異作用点阻害型殺菌剤の影響解明		←		→	農業環境技術研究所	農薬影響軽減ユニット
15 北海道における主要小麦品種の赤かび病抵抗性発現とマイコトキシン産生性との相互作用の解明		←		→	北海道農業研究センター	病害研究室
16 麦類における赤かび病かび毒蓄積様式の解明		←		→	九州沖縄農業研究センター	病害生態制御研究室
3　世界的に信頼される分析データ提供システム等の基盤構築						
(1) 国際基準に則った食品の安全性保証システムの構築						
1　かび毒分析法における分析精度とその要因に関する検討	←			→	信州大学	農学部
2　マイコトキシン分析の信頼性確保のための外部精度管理調査システムの開発		←		→	(財)食品安全センター	食品衛生事業部
3　国際データ共有によるカンピロバクター食中毒菌の迅速検知・種同定システムの開発			←	→	食品総合研究所	企画調整部
4　腸管上皮細胞を用いた有害物質の腸管透過性評価技術の開発とその応用		←		→	東京大学大学院	農学生命科学研究科
5　作物における重金属元素等の動態解析と制御		←		→	東京大学大学院	農学生命科学研究科
6　魚介類中のカドミウムおよび水銀の濃度現状把握、分析手法の確立、および存在形態の解明		←		→	水産総合研究ｾﾝﾀｰ中央水研	品質管理研究室
7　食品中に含まれる鉛等重金属の実態解明		←		→	食品総合研究所	分析科学部
8　米同一品種の DNA 解析による産地判別	←		→		食品総合研究所	食品素材部
9　米の DNA 品種判別法の試験室間共同試験による妥当性確認				⇔	食品総合研究所	食品素材部
10　イチゴ DNA 品種識別法の開発と試験室間共同試験による妥当性確認				⇔	野菜茶業研究所	機能性解析部
11　X 線分析を用いたコメ及び栽培土壌の成分分析技術の開発	←		→		国際農林水産業研究ｾﾝﾀｰ	生産環境部

注）文中の図、表、写真に付した番号は、課題番号とその中の一連番号を組合せて表示してある。
（例：１－(1)－１）－①の課題の１番目の図の場合は、図1111-1と表示）

Ⅵ　研究結果

１　トレーサビリティ・品質表示の裏付けとなる研究開発

(1) ユビキタスによる食農情報提供技術の開発

平成17年に施行された農産物の生産情報公表 JAS に対応して、これらのデータをネットワーク上に XML 形式で蓄積し、それをユビキタス情報として誰でもどこでも再活用できるシステムの開発を行った。本機能は、既に実用的に使われている青果ネットカタログ「SEICA」（http://seica.info）のオプション機能として実装した。今後、生産情報公表 JAS の普及に貢献することが期待される。

また、流通段階では、直売所等の店舗において、トレーサビリティに使われている識別子を販売管理や入出庫管理にも使える全く新しい POS システムを開発した。具体的には、SEICA のカタログ番号を利用した商品コードを使って、レジ打ちの際に商品の生産情報を顧客に見せることに通じるものである。本システムは、従来の JAN コードや店舗固有のインストアコードとも併用でき、将来、精算時に蓄積した購入商品データと、ポイントカード等で蓄積される顧客識別データを組み合わせることにより、これまでにないコミュニケーションシステムやマーケッティングへの発展することが期待される。

また、店舗等においては、生産情報とともにレシピ情報も、消費者が買い物中に欲しい情報のひとつであることが様々な調査でも明かになっている。一方、近年、ネットワークの普及にともない、IC タグが話題になっている。既に、農産物に IC タグをつけて生産履歴情報を公開するなどの実証試験も各所で行われているが、IC タグのコストだけでなく、読み取り装置の普及や規格の統一が不透明なため、実用には程遠いのが現状である。そこで、食品分野における実用的な用途としてスーパー店頭や一般家庭において利用可能なレシピ開示端末をとりあげ、民間各社の IC タグが容易に対応可能な汎用性をもたせて、レシピと生産情報が閲覧できるシステムを開発した。これらを用いた実証試験において、利用者へのアンケート調査を実施した。IC タグ利用による食の情報開示システムの実用性と問題点が適確に把握され、今後の開発・活用用途への指針が得られた。

加えて、現行のトレーサビリティシステムでは、生産情報のみの提供が主体であるが、消費者段階では、生産情報のみならず品質情報もわかりやすい形で開示することが求められている。そこで、(財)日本穀物検定協会と連携し、ID 付与された米を対象に生産関連情報と品質関連情報の両方の同時閲覧でき、Web を介してアンケートがとれるシステムを構築した。(http://komeinfo.jp)。

(2) 農産物の品種判別技術の開発

米加工製品(121)では、既存の市販キットでは不可能であった市販の米飯、餅、米菓等を対象とした判別技術を開発した。コンニャク加工製品(122, 123)では、コンニャク精粉および飛粉など加工製品を材料に品種判別の可否を検証した。麦類(124, 125)では、加工製品(ゆで麺等)での品種判別法と他品種の混入程度やその実証とマニュアル化を行った。大麦・裸麦加工製品(126, 127)では、加工製品(味噌、麦茶)からの DNA 抽出法の検討と SSR マーカーの選抜を行った。豆類加工製品(128, 129)では、育成者(北海道)の許諾なしに国内外で違法に流通するインゲン豆「雪手亡」の品種判別とアズキの加工製品(餡)等を対象に SSR マーカーの開発とマニュアル化を行った。ネギ(1210)では、品種内多型が非常に高く、品種判別が不可能なことから、マーカー座を固定させた品種を育成する手法(品種標識法)を開発した。野菜類(1211)については、DNA の多型頻度が極めて低いナスにおいて、識別能力の高い SSR マーカーとその検出法を開発した。野菜加工製品(1212)では、輸入加工品(漬物)と輸入白菜(キムチ)の品種判別法の開発と実証試験を行った。有機農産物か否かの判別技術の開発(1213)では、土壌の $\delta^{15}N$ 値を測定することにより、有機質肥料と化学肥料施用との判別の可能性を明らかにした。果樹加工製品(1214)では、モモから80種類の SSR マーカーを開発するとともに、ナシの SSR マーカーを用いて、乾燥果実、ジュース、缶詰などナシの果実加工品の DNA 鑑定とマニュアルを完成させた。モモ(1215)では、主要品種の判別に有効な SSR マーカーを用いて、生果実と缶詰での品種判別が可能であることを明らかにした。カンキツ(1216)では、市販品果汁飲料からの DNA 抽出条件の検討と SNPs マーカーの開発を試み、DNA 鑑定の作業性と安定性の向上を図った。また、リンゴ(1217)では、果実加工製品(チップス、ジュース)について品種判別法の確立と市販品について実証試験を行った。キノコ類(1218)では、市販シイタケ151品種を判別する簡便で高精度な DNA 品種判別法を開発した。品種判別技術の高精度化(1219)では、餡など、品種がブレンドされる可能性がある練り物製品を対象に、トランスポゾン・ディスプレー法を用いて品種固有マーカーを検索した。

(3) 畜産物品種・個体判別技術の開発

国内産牛では AFLP 法に基づいたゲノムスキャニングを黒毛和種とホルスタイン種に適用し、簡便な SNP 検出法の開発により、交雑種を含む品種の識別が可能となった。さらに、黒毛和種、ホルスタイン及びその交雑品種を PCR-RFLP 及び PCR を用いて判別する分析方法について、国内の複数機関が参加する共同試験を計画・実施し、その分析法の妥当性が検証できた。豪州牛については、Y 染色体やミトコンドリア DNA を中心としたインド牛特異的なマーカー開発とその有用性を探り、AFLP 法を利用したマーカー開発を進め豪州産牛肉と国産牛肉を80%の検出率で鑑定できる方法を開発した。ウシの個体識別法を高い次元で担保するため、多型性の高い 8 マーカーを選択し、一本のチューブ内で同時に PCR 増幅のできる簡易な方法を開発し、このマーカーセットを用いた場合、国際標準化マーカーを上

回る父子鑑定判別率を得ることができた。日本短角種の個体識別に適したマイクロサテライトマーカーセットを構築するとともに、マルチプレックス PCR により省力的に個体識別を行う技術を開発した。また、この個体識別技術を用いることにより、流通牛肉の個体認証ができることを示した。

複数のブタ品種に由来するブタ各種臓器を用いた完全長 cDNA ライブラリーにより、2,300個以上の SNP の検出を行ない、このうち200個の SNP について11品種96個体におけるアリル分布の調査結果を、Web 上から検索できるシステムを構築することにより、品種内での個体識別、品種間の識別に応じた SNP の選択を行うことが可能となった。ブタの毛色に関与する10個の遺伝子の配列を新規に確定し、特に、金華豚に特異的な *EDNRB* 遺伝子の変異(Pro64Ser、金華豚では Ser)を検出した。

鶏肉生産に用いられている代表的な品種のうち、核 DNA について AFLP 解析を行った結果、比内鶏、土佐地鶏、およびニューハンプシャーの 3 品種において、品種識別が可能な SNPs が得られた。日本鶏各品種が示す遺伝的変異性は、外国由来商用鶏各品種とほぼ同程度であったが、遺伝的に異なるクラスターに分類された。作成した品種特異的大規模アリル頻度表は、鶏肉の品種識別のためのツールとして有効活用できると考えられた。名古屋コーチンに特徴的なマイクロサテライトマーカー 5 個を見出し、名古屋コーチンと他の鶏を識別できる DNA 識別手法を開発した。比内鶏に特徴的なマイクロサテライトマーカー10個を見出し、同マーカーによる比内地鶏の DNA 識別の可能性が示された。ニワトリ mtDNA の D ループ領域を、3 品種のニワトリ間で比較し、11カ所の SNP を見つけた。さらに、その内の 5 カ所をタイピングできる、ミスマッチ塩基導入プライマーを開発し、SNP タイピングにより、4 品種の mtDNA を 5 種類に分類できることを明らかにした。

(4) 食品の生産・流通履歴の迅速検証技術の開発

魚体及びドリップの近赤外スペクトルから凍結履歴の判別可能であった。数種の脂肪酸を組み合わせることにより天然魚と**養殖魚の判別の可能性が示唆された**。DNA コメットアッセイ法、炭化水素法、シクロブタノン法を組み合わせることにより**放射線照射肉類**の検出が可能と判断された。**近赤外分光法と DESIR 法を併用することにより ppm レベルの残留農薬の測定が可能となった**。

2　食品の安全性に関するリスク分析確立のための研究開発

(1) 最近判明したリスクの解明と制御およびコミュニケーション

5 グラム程度の食品試料から再現性よく信頼性の高いアクリルアミドの分析値を得られる分析法を開発したことにより、多数試料の分析が可能になり、低温貯蔵バレイショの還元糖増加によるアクリルアミド生成量の著しい増加について世界に先駆けて報告することができた。茶分析試料におけるカテキンの妨害も明らかにし、前処理法を検討し、茶のアクリルアミド分析に貢献した。

品種や貯蔵条件の異なる388のバレイショ試料について分析を行ったところ、これまでにない広範囲の還元糖含量を有するバレイショに関するデータが得られた。バレイショのいずれの品種においても、8 ℃未満の温度域での貯蔵において生イモ中の還元糖量が顕著に増加し、揚げ加工後のチップ中のアクリルアミド量も増加した。遊離アミノ酸含量については、貯蔵温度による顕著な違いはみられなかった。揚げ加工前の生イモのアスパラギン含量が約 2 %、フルクトース含量が約 1 %のときに、揚げ加工時の両者の反応率が共に最大となり、このときの両者の比（[Fru]/[Asn]）は約 2 であった。この点を境に、[Fru]/[Asn]比が小さい領域では、フルクトース含量がアクリルアミド生成における制限要因となり、大きい領域ではアスパラギン含量がアクリルアミド生成における制限要因となるが、アスパラギンがアクリルアミド生成の制限要因になるほど還元糖が多いイモは著しい焦げ色を生じ、通常のポテトチップ加工に用いられることはない。したがって、加工用原料や家庭内調理で消費されるバレイショにおいては、アクリルアミド量は生イモ中の還元糖量と高い相関を示し、実質的には糖含量がアクリルアミド生成の制限要因となる。なお、チップカラーL*（明度）とアクリルアミド量にも高い相関が認められ、従来のカラーに基づいたチップ加工用系統の選抜法が、アクリルアミド低生成型系統の選抜においても有効であること、メーカーにおけるチップ製造ラインでの不良カラーチップの除去が、製品への高アクリルア

ミド含有チップの混入を防ぐ上で有効であることが証明された。

茶の中では焙じ茶のアクリルアミド含有量が高く、250 μg/kg から1880 μg/kg（n=12）で、その浸出液はアクリルアミドを 5 μg/kg から41 μg/kg 含有していた。煎茶、ウーロン茶、紅茶のアクリルアミドレベルは、焙じ茶の 1 /10程度であった。茶に含まれるアクリルアミドは､原料茶葉を180℃で10分焙煎したときに最高になり、また焙煎後のアクリルアミド含有量は原料茶葉のアスパラギン含有量の影響を強く受けることが判明した。摘採後の生葉を貯蔵すると、アスパラギン含量が増加し、そのため焙煎後のアクリルアミド生成量も多くなった。

スギヒラタケ中のマウスに対する致死性毒は、熱に強い水溶性高分子であることが判明した。現在、致死活性を指標に、各種クロマトグラフィーを駆使して毒物質の単離を試みており、最も精製が進んでいる画分は約25 mg/kg（マウス 1 匹当たり 1 mg 以下）で致死活性を示している。スギヒラタエから精製したレクチンは、腹腔内投与では150 mg/kg、静脈内投与では15 mg/kg でも毒性を示さず、レクチンの毒本体説は否定された。単離を試みている毒性物質がヒトの急性脳症の発症に関わっているか否かは現在のところ不明であるが、マウスに脱髄病変が起きるか否かを検討中である。

市民を対象にした意識調査の結果、食に対する意識は女性、特に小さな子供を抱える主婦が高く、男性はあまり関心がないという固定概念は正しくないことが示された。一方、年代ごとに関心の程度に差があり、20代が特に低く、年代が上がるに従って関心は高くなった。食品の安全性への関心は、購買行動とほぼ結びついていた。本研究では、これまでのリスク認知研究で明らかにされてきた一般の人々のリスク認知を構成する「被害の甚大さ」と「未知性」の次元とは別に、「将来への社会的不安」の次元を抽出した。食への関心が低く、かつ、食品の安全性に対する関心も低い群を除き、市民の食品「ハザード」に対する認知は、極めて似通っていることが判明した。この結果から、食や食品に対する関心や懸念が比較的高いと思われる調査協力者対象の調査でも、社会のマジョリティの意識を反映しているとみなすことが必ずしも妥当性を持たないわけではないことが示唆された。

(2) 食品衛生管理における有害微生物の増殖予測・検出技術の開発

食品微生物パン酵母が糖を発酵して炭酸ガスを発生する原理を利用して、ガスの発生で管理温度異常を目視で簡単に判別できる安全・安価な微生物センサーの開発に成功した。実証試験により、実用化可能であることが明らかとなった。環境から採取した毒素遺伝子を持たない無害の腸炎ビブリオの長期保存株中から、食品を汚染している病原性腸炎ビブリオと寒天培地上で区別できる変異株が選択できた。そして流通を模したモデル実験により、選択した変異株が挙動解析に利用できることが明らかとなった。食品からの腸炎ビブリオの高感度・迅速・簡便な定性的検査法として、大量培養-PCR 法、および LAMP 法を開発した。簡便迅速な定量検査法として、MPN-PCR 法およびリアルタイム PCR 法を開発した。MPN-PCR 法は、従来の培養法とほぼ同等の成績を迅速・簡便に得られた。ボツリヌスの迅速リスク評価法については、すでに確立した DNA モニタリングの欠点をカバーするためにボツリヌス菌のmRNA発現を検知するリアルタイム定量 PCR 法を *in vitro* 系で確立した。Multiplex PCR 法により、*C. jejuni* および *C. coli* の簡易迅速同定法を確立させた。また、鶏肉から分離される *Campylobacter* 属菌、*Arcobacter* 属菌および *Helicobacter* 属菌の簡易鑑別法についても同法により確立した。我が国では全く検討されてこなかった、ヨーネ菌の生死判別には従来法の培養法では三ヶ月以上を要したが、CFDA 蛍光試薬を用いた数時間で判別できる手法を確立した。そしてヨーネ菌殺菌法開発のために必要な牛乳プラントに近い加熱温度条件の再現試験法による評価システムを構築した。食品を汚染する有害微生物の増殖を、食品の受けた温度履歴から予測する数学モデルを新たに開発し、それが変動温度を含めた各種温度条件下における微生物増殖予測有効であることが明らかとなった。食品内の熱伝導式を基に、食品の表面温度から内部の汚染微生物増殖を予測するシステムを開発した。

(3) 食品衛生管理のための有害微生物制御技術の高度化

微生物付着防止技術に関しては、野菜等の農産物表面の付着防止剤の検索を実施し、いくつかの素材

に結合阻害を見出した。搾乳牛の乳房の清浄化においては、環境に優しい自然生成物であるアルギン酸塩を基材として用いた乳頭保護シールを開発し、特許出願した。さらに作業性の向上と効果の改善を図った。食品装置表面を想定したポリプロピレン表面での大腸菌の増殖ならびに死滅の経過を明らかにし、固体表面上の微生物動態をモデル化した。

微生物・バイオフィルムなどの除去・殺菌技術に関しては、天然抗菌剤については、発酵食品からナイシンの代替物になりえる抗菌物質を生産する微生物の分離を行った。化学薬剤については、レタスやキャベツの常在菌の分布や菌の属を明らかにし、次亜塩素酸ナトリウム処理の食中毒菌に対する効果、さらに温熱処理の併用効果とその問題点を明らかにした。放射線照射及び低エネルギー電子線照射では、国産高品質の低脂肪豚ひき肉の放射線照射研究において、3 kGy の照射量により常在菌や接種したリステリアを完全に殺菌できること、処理による脂肪酸酸化レベルに殆ど差異は認められないこと、照射により、かおり・食感に関しては有意差があることを明らかにした。交流高電界殺菌装置の改良や殺菌処理を実施し、最適処理条件の設計のための制御因子を明らかにした。この技術については現在実用化が協力企業において実施中である。アルカリ性電解水での予備浸漬後の強酸性電解水処理でバイオフィルム中の大腸菌を死滅させることを確認した。液卵、トマトジュースを用いた試験で高圧耐性の高い菌株を選別して超高圧殺菌データを取得し、処理後の低温保存が病原菌の活性化を妨げることを示した。さらにリステリアなどの病原菌の死滅と環境因子との関係を明らかにした。バイオフィルム除去効果のある酵素のスクリーニングを実施した。熱死滅データベースの構築では、本研究における実験データとそれ以前に行ってきた当研究室での実験データをまとめ、レコード数750、D 値数1252、z 値数138の蓄積を得た。薬剤については過酢酸と過酸化水素について基本的なデータを得た。

(4) 天然毒素等の汚染実態調査及び検出技術の高度化

オクラトキシン分析法の検討では、LC-MS と多機能カラムによる精製を応用した、麦中オクラトキシン A 分析法を確立した。また、多機能カラムのみでは精製が不十分な場合、イムノアフィニティカラムによる精製が有効であることも確認した。さらに、市販 ELISA キットは、5 μg/kg 以上の汚染があるものについては有用であることを明らかにした。確立した分析法を用い、外麦、小麦粉とその調整粉、パン粉・スパゲティ・マカロニ・うどん・オートミール等の加工品及び国内産米の汚染実態調査実施したところ、外麦及び麦加工品の一部にオクラトキシン汚染が確認された。さらに、市販イムノアフィニティーカラムカラムを応用した、飼料中オクラトキシン A 分析法を確立した。また、陰イオン交換カートリッジによる同時精製を応用した、飼料中オクラトキシン A、シトリニン同時分析法も確立した。さらに、HPLC カラムスイッチング法による血液オクラトキシン A 分析法を確立し、屠畜場で採取した豚血液を分析した。分析したおよそ450頭の豚血液のほとんどからオクラトキシン A が検出されたが、その濃度はきわめて低かった。また、地域による差および季節変動も見られなかった。カラムスイッチング法は、牛乳中オクラトキシン A 分析にも適用できた。

リンゴの青カビ病とパツリン汚染に関する検討では、国内のリンゴジュース工場に集積されている原料果実に、パツリン産生能を有する青かび病菌の被害を受けた果実が混入し、国産ジュース原料も常にパツリン汚染の危険にさらされていることを明らかにした。また、青かび病菌のリンゴ果実への感染様式を調べ、果皮を突き破るような外傷が病原菌の侵入門戸として最も適していること、自然に果面に発生する、つる割れ、果面さび等の傷口も侵入門戸になりうることを明らかにした。さらに、酸素透過性プラスチックバッグを用いた貯蔵により、青かび病菌によるパツリン産生および伝染源となる青かび病菌分生胞子の形成を抑制できることを明らかにした。また、HPLC によるリンゴジュース中のシトリニン定量法を確立し、パツリン産生菌を接種した国産主要品種リンゴ果実から調製した果汁を分析し、パツリン及びシトリニン産生能の差異を調査した。その結果、パツリン産生能に品種間差異があることを明らかにした。また、パツリンと比較して含量は少なかったものの、シトリニンも産生されることを確認した。2005年に収集した国産果実を原料としたリンゴジュース100点のパツリン、シトリニン分析を実施した結果、いずれのマイコトキシンも検出されなかった。さらに、パツリンについては GC-MS 法

により、オクラトキシン、シトリニンについてはHPLC 法により、リンゴのほかブドウ、洋ナシ等の果物中の当該マイコトキシン分析法を確立した。リンゴ以外の果物にパツリン産生菌を接種した結果、洋ナシでも高濃度のパツリンが産生されることを明らかにした。

フモニシンの分析法の検討では、トウモロコシおよびコメ中のフモニシンを分析するため、固相抽出法や蛍光ラベル法の検討を行い、HPLC-蛍光検出法およびLC-MS/MS 法による分析法を確立した。また、トウモロコシ中フモニシン B_1 およびフモニシン B_2 の分析技能試験 FAPAS に参加し、分析値の信頼性の保証を受けた。

トリコテセン分析の検討では、デオキシニバレノールの精製に用いられているRomer 社製のマルチセップ#227を使用し、DON、 3 -Ac-DON、Fus. -XおよびNIV の精製を試みた結果、短時間でほぼ100％の回収率をもつ精製ができることが明らかになった。ステリグマトシスチン分析法の検討では、市販固相抽出カラムを応用することにより、コメおよび麦中のステリグマトシスチンを効率よく精製できることを明らかにした。

LC-MS によるマイコトキシンの網羅的分析法の開発では、各種市販マイコトキシンの MS スペクトルデータを蓄積した。また、黄変米マイコトキシンの一つであるルテオスカイリンを糸状菌の培養液から調製し、同様に MS スペクトルデータを得た。これらの結果に基づき、複数のマイコトキシン混合溶液についての同時分析条件を決定した。

アフラトキシンの産生制御法に関する検討では、自然界からアフラトキシン生産阻害菌をスクリーニングし、*Achromobacter xylosoxidans* を分離するとともに、この菌が産生するアフラトキシン生産阻害物質を cyclo(L-leucyl-L-prolyl) と同定した。さらに、cyclo(L-leucyl-L-prolyl) がアフラトキシン生産制御遺伝子 *aflR* の発現を抑制する事を明らかにした。また、糸状菌の代謝産物から AF 生産阻害活性が得られ、精製に成功した。ワサビ由来ペルオキシダーゼ等ヘム含有酵素がアフラトキシン B_1 分解活性を示し、さらにヘミン単独でもアフラトキシン B_1 の変異原性が消失することが確認され、得られた成果について特許出願した。

トリコテセンの毒性作用に関する検討では、ニバレノールの HL-60細胞（ヒト造血系由来培養細胞）に対する細胞毒性を解析し、ニバレノールが HL-60細胞にアポトーシスを誘発すること、これにより細胞の形態が変化することを明らかにした。また、カルシウムキレート剤の BAPTA-AM が、ニバレノールの細胞毒性を軽減することも明らかにした。さらに、デオキシニバレノールの子豚に対する影響を解析し、デオキシニバレノールが、豚の肝臓および胸腺、回腸パイエル板などのリンパ組織にアポトーシスを誘発することを明らかにした。また、消化管（胃底から幽門部）粘膜に出血・壊死を起こすことも明らかにした。

(5) 栽培技術等による赤かび病カビ毒のリスク低減技術の開発

Fusarium graminearum（狭義）と *F. asiaticum* の同定のため、ヒストン H 3 、reductase、MAT 遺伝子領域について種特異的 PCR プライマーを設計し検証した。トリコテセンを不活性化する遺伝子およびゼアラレノンを解毒する遺伝子をモデル穀類のイネに導入し、それぞれ病徴の軽減および毒素の低減化に有用であることを示した。赤かび毒素生合成に関連する遺伝子領域から定量 PCR 用プローブを作製して遺伝子定量を行ったところ、標的遺伝子量の増加と産生される毒素量の間には高い相関性があった。日本の北部(北海道)は *F. graminearum* s. str. 、南部は *F. asiaticum* が優占種となっており、東北地方では両種が混在していた。また、*F. graminearum* s. str. と *F. asiaticum* では毒素タイプ構成が明確に異なることを明らかにした。可視光域や近赤外光域を用いた色彩選別機により、原料から赤かび病汚染粒を除去し、DON 濃度を低減できた。また、精麦製粉を行うことにより、小麦粒および小麦粉の DON 濃度を低減できた。北海道における試験事例では、開花始から 1 週間間隔で 2 回散布すると高い効果が認められ、 2 回、 3 回、 4 回散布で防除効果に差は認められなかった。また同試験では発病穂由来の外観健全粒からは *F. graminearum* が高率に分離され、健全穂由来の外観健全粒と比較して高濃度で DON に汚染されていた。北日本 5 県の圃場を調査したところ、いずれの県においても赤かび病の発生を確認するとともにその原因となる菌の多くが NIV 産生型の *F. asiaticum* であることを明らかにした。また、イネの

出穂始めから出穂期が感染に好適な時期であることを明らかにした。関東地域における試験事例では、テブコナゾール水和剤、チオファネートメチル水和剤およびメトコナゾール乳剤は赤かび病防除に関して予防効果とともに治療効果も認められた。一方、アゾキシストロビン水和剤は予防・治療効果ともに認められなかった。東海地域における試験事例では、稲株の除去が耕種的防除法として有効であること、ブームスプレーヤ及びラジコンヘリによる少量散布は、各剤とも高い防除効果が認められ、省力防除法として有効であることを明らかにした。九州地域における試験事例では、圃場における赤かび病菌の各個体群は毒素産生型、産生能、遺伝的多様性が極めて高かった。圃場内の空間分布の解析により、発病穂は有意に集中分布し、各調査時の個体群がそれぞれ集中点を形成していることが明らかとなった。赤かび病菌が感染したムギでは、倒伏により、本菌が産生するかび毒の子実汚染濃度が高くなることを明らかにした。また、メトコナゾール，テブコナゾール，キャプタン，有機銅，無機銅，チオファネートメチル，亜りん酸肥料が優れた赤かび病抑制効果を示し，かび毒も有意に減少させた。チオファネートメチルゾル剤，同水和剤，およびメトコナゾール乳剤は耐雨性が高かった。チオファネートメチル水和剤はイネ赤かび病の防除およびかび毒低減効果が高かった。コムギの出穂期予測モデルを MetBroker 対応の Java プログラムとして開発した。さらに、赤かび病発生程度の予測モデルも同様に MetBroker 対応の Java プログラムとして開発した。関東地域の試験事例では、コムギ品種の赤かび病抵抗性程度と DON の産生量とは必ずしも相関しなかった。あやひかりは抵抗性が中程度であるが、DON や NIV の産生量は常に少なく、かび毒産生抑制型品種と位置づけられた。わが国に分布する赤かび病の主要病原菌について、ベンゾイミダゾール系薬剤、DMI 剤、及びストロビルリン系薬剤に対するベースライン感受性データを取得した。また、コムギ圃場におけるストロビルリン系薬剤の散布が、赤かび病菌の種構成に影響することが示された。北海道の主要品種を用いた試験では、かび毒は感染初期から検出され、小穂内での菌の急速な増殖に対応して麦粒等に多量に産生されていた。かび毒産生量は感染時期および品種間で差がみられ、抵抗性品種では頴および果皮で菌の進展を抑制することでかび毒の産生も抑制していることが推察された。コムギでは、登熟期間後半に、既感染菌による DON・NIV 蓄積量の大幅な増加と新たな感染による DON・NIV の蓄積が起こることがわかり、またオオムギでは、抵抗性強の二条品種では開花期よりも後期の感染が毒素蓄積には重要であることを解明した。

3　世界的に信頼される分析データ提供システム等の基盤構築

(1) 国際基準に則った食品の安全性保証システムの構築

1)①WHO が行ったチェックサンプル試験プログラムと英国 CSL による FAPAS による PT の結果を、FAPAS が通常使用している統計解析手法で比較検討したところ、いずれのマイコトキシンの分析においても、検出法の主力が薄層クロマトグラフ（TLC）による方法から、高速液体クロマトグラフ（HPLC）による方法に変化していったことが示された。またこの間における分析の真度の変化を、PT でその結果の評価に通常用いる z スコアにより比較をしたところ、いずれの分析法においても |z| が 2 以下の機関の数が大幅に増え、分析の真度が向上していることが示された。②ルブラトキシン B の ELISA 分析のために作製した抗体は、試料溶液として、50%メタノールあるいは10%アセトニトリルを用いても測定可能な耐溶媒性の優れた抗体で、0.1 μg/mL から100 μg/mL の濃度範囲で測定可能であることが分かった。HPLC による RB の分析は、C18カラムを用いた逆相条件で、水ーアセトニトリルの混合液を移動相とし、アセトニトリル濃度によるグラジエントをかけることによりほぼ満足するクロマトグラムが得られ、定量限界は10 ng であった。③試料の粉砕とサブサンプルの作製を同時に行うことの出来るサブサンプリングミルで、3 つの吐出口を持つ（3 つのサブサンプルが同時に得られる）装置を用いてその吐出口間での均一性を確認したところ、3 つの吐出口間では吐出量には大きな違いはあるものの、得られた試料の内容はかなり均一であり、吐出口間での有意差は見られなかった。小麦中の OA の分析法として、多機能精製カラム（MFC）と抗体を結合したカラム（IAC）を用いて前処理をする方法を検討し、精製には IAC を用いることとした。IAC を用いる方法に関

して、抽出条件を含めて検討し、SLV を行ったところ、OA の HPLC による検量線は0.01 ng から 2 ng の範囲で直線であり（R^2=0.999）、0.5 μg/kg の OA を各々の試料に添加して行った回収試験（いずれも 6 回の繰り返し）での日内差は RSD で5.7～16.7%、その時の平均回収率は82.6～110.2%、 5 μg/kg では各々3.7～8.4%と75.4～94.0%、同じく日間変動は、0.5 μg/kg では、3.5～11.2%で82.4～99.6%、5 μg/kg では3.6～4.8%で、92.3～102.9%であった。

2）①2003年度より2005年度までの 3 年間にわたって DON ならびに NIV の検査を実施している検査機関を対象とした外部精度管理調査を全 6 回行ったが、各参加機関において採用している手法は ELISA 法、液体クロマトグラフ法およびガスクロマトグラフ法であった。変動係数はほとんどの実施回において25%以下であり、HorRat 値もほぼ1.0であった。採用手法ごとに解析結果を比較すると、ELISA 法による測定結果は他の機器分析による測定結果よりも大きな変動係数となる傾向が認められた。それぞれの参加機関について経年的な z スコアを観察すると、全ての外部精度管理調査実施回において z スコアの絶対値が 2 を超えた機関は認められなかったことから、特定の機関のみで検査技能が劣ることはないと判断された。②返送された結果に明らかな異常値が認められた2004年度のデータを用い、各種統計解析手法を用いた際の z スコアについて比較検討したところ、平均値と標準偏差を用いた従来法と比較して、ロバスト法ならびに Horwitz 式による解析でより多くの限界外機関を発生させた。

3）① 供試菌株として、USDA-ERRC と USDA-NADC の協力により保存株の *Campylobacter* 属菌12種とその近縁種である *Arcobacter* 属菌 4 種、その他 2 株を用いた。塩化セシウム遠心法にて各々の核酸を抽出したところ、極めて純度の高い精製 DNA を得た。②設計された共通プライマーは、収集した *Campylobacter* 属菌12種を全て増幅させることが可能であり、アンカープライマーのシークエンス反応により、菌12種全てについて増幅産物の塩基配列決定を行った。③*Campylobacter* 属 *gyrB* 遺伝子の塩基配列から多重整列表を作成し、その相同性を求めたところ、種間相同性はおよそ80－60%程度であり、本遺伝子の可変領域から、遺伝子手法による簡易同定手段を作製できる可能性を示唆した。また、本遺伝子によって進化系統樹を作成したところ、従来の16S-rRNA 遺伝子によって作成された進化系統樹とほぼ類似した形であったが、種間を比較する場合には本遺伝子は16S-rRNA 遺伝子よりも変異が多いことから解像度が高く得られると考えられた。④相同性比較結果を基に、PCR-RFLP によるキャンピロバクター種の簡易迅速同定技術の開発を試み、多重整列表から作成した共通領域を増幅する共通プライマーセットを作製し PCR に供したところ、いずれの菌種においても900-bp の増幅産物を得ることが可能であった。また、得られた増幅産物を特定の制限酵素にて消化させ電気泳動に供すると、各々の種によってフラグメントパターンが異なることが分かった。

4）①Caco-2細胞層を用いた実験により、カドミウムはプロトン依存的なトランスポーターを介して細胞内に取り込まれること、また TBT は拡散による受動輸送で細胞層を透過していることが確認され、構築した実験系が本研究の目的に有効であることが示された。卵黄タンパク質分解ペプチド（YP）とカゼインカルシウムペプチド（CCP）に顕著なカドミウム取り込み阻害効果が観察された。ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて YP とカドミウムとの結合性を調べた結果、YP へのカドミウムの吸着が確認されことから、ペプチドへの吸着がカドミウム吸収抑制の主要な機構と考えられた。一方、TBT の透過は、ペプチド類による影響はあまり受けず、むしろカゼインや乳清タンパク質およびその分解によって生成する高分子量のペプチドによってその透過性が抑制された。②Caco-2細胞層を透過した TCDD を、TCDD 応答性のレポーター遺伝子を導入した HepG 2 細胞株を用いて測定することにより、腸管透過評価系を作成することができた。この実験系を用いて TCDD の透過を抑制する食品因子を探索した結果、不溶性食物繊維、クロロフィル、茶殻等に抑制効果を見出した。③Caco-2 細胞のカドミウムによる IL-8分泌亢進機構の解析に、real-time PCR 法を用いて IL-8 mRNA 発現量を測定したところ、カドミウム処理によって IL-8 mRNA 発現レベルが有意に増加していることが確認された。さらに ELISA 法を用いた分析で、カドミウムは時間依存的・濃度依存的に IL-8 タンパク質の分泌を誘導することが示された。④カドミウムが Caco-2細胞における炎症性サイトカイン

IL-8の分泌を亢進したことを受け、*in vivo* でのカドミウムの効果をマウスを用いて検討し、腸管での炎症性サイトカイン IL-8のカドミウムによる発現誘導は、培養細胞系のみならず実際の腸管組織においても起こることが明らかになった。また、MIP-2の発現上昇とともに、炎症反応関連酵素である Myeloperoxidase の活性も上昇する傾向が認められ、カドミウムの腸管炎症惹起効果が示された。

5)①植物全体に Cd 蓄積量が多い品種として、納豆小粒、サチユタカが、少ない品種としてタチナガハが選抜された。また、地上部への Cd 移行性が高い品種としてスズユタカが、低い品種としておおすずを選抜した。②植物中元素濃度について放射化分析ができる元素の感度と定量性を照射時間や植物調製法を検討することにより求めた。放射化分析における主な検出元素は、Na, Mg, Al, K, Ca, Sc, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Sc, La, Br, Ba, Rb などであった。③Cd の植物中への蓄積は茎＞葉＞種子＞さやの順で高く、品種間差異も大きかった。今回用いた土壌（抽出液 0.14 ppm Cd）では可食部への Cd 蓄積は0.2 ppm を超える品種があった。Cd の他元素蓄積への影響は元素毎に異なる濃度を示したが、種子中濃度は Cd, Zn を除く殆どの元素で一定値であった。④土壌ＡからＤにおいて Cd のみならず他の 6 種類の元素全ての濃度が単調増加する傾向がみられた。この 4 段階に Cd 濃度を設定した土壌を用い、植物体中の Cd の蓄積量を調べたところ、品種別にはスズユタカの Cd 蓄積が最も高く、サチユタカの Cd 蓄積は低かった。⑤Mg による Cd 障害緩和が観測された。また多元素同時測定が可能な放射化分析法により、Cd 処理による他の元素濃度への影響は、Na、Mg、Al、K、Ca、Mn、Sc、Cr、Co、Zn、Br、Rb、Ba、La および Yb にみられた。⑥Cd トレーサー^{109}Cd を取り込ませた試料の薄切片を作製し、遮蔽環境下で IP に 1 ヶ月間コンタクトした後、高性能 BAS で読みとることにより組織レベル（数100μm）での Cd 分布の可視化が可能となった。また、pH4.5から6.5に上昇すると地上部への Cd 移行量が減少するが^{15}O を用いた実験により水の地上部への移行が減少する傾向がみられた

6)①キンメダイ、クロマグロ、およびメバチで高いレベルの水銀蓄積が認められたので、これらの魚種について体重との相関を調べたところ、キンメダイでは相関係数は総水銀0.862、メチル水銀0.812と、高い正の相関が認められた。相関係数はメバチで0.852および0.824、クロマグロで0.920および0.929だった。原子吸光法によるカドミウム分析の結果、135検体中のうち87検体は0.01 ppm の検出限界未満であった。筋肉は0.01 未満～0.11 ppm だった。②ICP-MS によるカドミウム分析システムを検討し、検出下限0.2 ppb, 定量下限0.5 ppb を構築した。FAPAS による真度試験の結果、カドミウムの測定値のｚスコア0.1で良好な精度が得られた。③クロマグロ筋肉中の水銀は大部分が筋原繊維タンパク質画分に存在し, その割合は全体の74-98%だった。普通筋の筋形質タンパク質画分には 4 %, 血合筋の筋形質タンパク質画分には12%分布していた。筋原繊維タンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し, スライスしたゲルを湿式分解後水銀分析することによって, 水銀結合タンパク質を検出する手法を開発した。この方法で, 水銀は主に筋原繊維タンパク質に検出された。筋原繊維タンパク質のミオシンから精製単離した水銀を特異的に含むタンパク質に結合した水銀はチオール還元剤処理によってタンパク質から容易に遊離した。

7)①鉛の定量下限（LOQ）は、試料によっても異なるが、乾物状態のものでは概ね0.02 mg/kg であった。鉛と同じ前処理で同時測定が可能なカドミウムも測定したところ、両元素とも、組成認証標準物質の認証値または参考値に対して、また外部精度管理事業(FAPAS))への参加でも良好な結果が得られた。②市販食品の測定結果は、流通している状態における重量あたりの含有量として算出したところ、鉛およびカドミウムとも現在設定中の Codex 基準値を超えるような試料はなかった)。 1 ～ 2 歳の年齢における農産物からの鉛摂取量は、成人に対して設定されている体重 1 kg 当たりおよび 1 週間当たりの耐用許容量（PTWI、25 mg/kg bw/week)に対し、測定値の取り扱いが<LOQ＝LOQ の場合には26.1%、<LOQ＝ 0 の場合には2.4%であった。

8)① 4 種類の産地の異なるコシヒカリのアミロース含量は16.8～19.7%、蛋白質含量は5.0～6.2%、糊化最高粘度は344～395 RVU、同最低粘度は122～147 RVU、米飯の硬さは2.31～4.73 kgf、米飯の粘りは0.54～1.43 kgf、米飯の付着／硬さは0.078～0.086、の範囲で、同一県内で異なる産地の

試料間の相違が県産の異なる試料間の相違を上回っていた。②開発したDNAマーカーを使用し、産地ごとのコシヒカリ30点について、PCRを行った結果、PCRによるコシヒカリの原種同士の識別が可能になった。③稲のいもち病性抵抗性を導入した同質遺伝子系統が全国で育成されつつあるが、RAPD-STSプライマーを用いて検討した結果、識別が可能となった。これらのDNAマーカーを用いて、公表遺伝子型と照合した結果、いもち病抵抗性とよく一致していた。

9)①新たに開発したプライマーを加えて10種類のSTS化プライマーおよび6種類のいもち病真性抵抗性遺伝子由来のプライマーを使用し、種苗管理センターと共同で、STS-RAPD法による135点の登録品種の識別データベースを作成した。②各種新潟コシヒカリBLのいもち病抵抗性遺伝子*Pia*、*Pii*、*Pita-2*、*Piz*、*Pik-m*に対応する識別用プライマーを開発した。これらを基に、実用的マルチプレックスプライマーセットを開発し、タカラバイオ社から市販を開始した。③作付け上位10品種および新潟コシヒカリBL(4種類のブレンド)を識別できる4種類のプライマーセットを開発した。④上記4種類のプライマーセットによる、10品種の識別の32機関による試験室間共同試験を行ったが、改善の余地があることが分かった。

10)①品種間で多型を示す遺伝子座だけを特異的に増幅するようにプライマーを改変したところ、25マーカー中24マーカーについて成功した。この結果、多型のパターンが極めて明瞭になり誤判定が回避できるだけでなく、DNAのホモ接合型とヘテロ接合型の差も検出できるようになりマーカーの識別能力も向上した。全てのマーカーが3：1または1：2：1に分離し、これらがメンデル遺伝に従って安定に遺伝していることが確認できた。マルチプレックス化が可能なマーカーの組み合わせを検討した結果、8通りの組み合わせで2マーカーの同時解析が可能であった。収集した128品種を分析した結果、長期にわたってランナー増殖で遺伝資源を保管したために、他品種に置き換わっているものが多く見られた。複数の保存場所で遺伝子型が一致した65品種のみをデータベースにまとめた。遺伝子型出現頻度P_Iを算出し、65品種中で最も高頻度の遺伝子型を持つ品種「八雲」でも、25マーカーを用いれば99.997%の確率で同定できることを確認した。また、これら全ての品種を99.9%程度の精度で同定可能な最少限のマーカーセットを選抜した結果、15のマーカーを併用することにより目的精度が達成できることを見出した。②試験室間共同試験による定性分析の妥当性確認試験では、全てのマーカーについて、AOACの定める10機関の基準を満たした。有効回答について感度、擬陽性率、特異性、偽陰性率を算出した結果、この試験法の再現性が極めて高いことが示された。

11)①熊本県下で栽培された5種類の有機JAS認証野菜(「表示有り」)と、同じ5種類の通常栽培野菜(「表示なし」)で、「表示有り」野菜の$\delta^{15}N$値は+6～+10‰となり、「表示なし」野菜では-0.3～+4.05‰となった。5種類の野菜の$\delta^{15}N$値は、+5‰を境として、全ての野菜で「表示有り」野菜ではそれ以上であり、通常栽培野菜ではそれ以下の値となった。②各地で生産された市場流通野菜106点、および民間、公立研究所で有機、無機栽培された野菜129点を収集して、$\delta^{15}N$値を分析したところ、市場流通野菜では、有機農産物表示の野菜の$\delta^{15}N$値は、同表示なしの通常栽培野菜よりも高い傾向が認められた。基準値として+4.0‰をとると、有機農産物表示のあった野菜では80.4%が+4.0‰以上の値となり、一方同表示なしの野菜は+4.0‰以上のものは45%だけであった。民間、公立研究所において栽培された野菜では、有機物施用区の野菜の$\delta^{15}N$値は、化学肥料施用区の野菜のそれよりも高い傾向が認められた。基準値として+4.0‰をとると、有機物施用区の野菜の97.6%が+4.0‰以上の値となったのに対して、化学肥料施用区の野菜では+4.0‰以上のものの割合は32.2%だけであった。③国内各地から集めた7種類の土壌を用いて、有機肥料または化学肥料を施用してイチゴを栽培し、収穫果実の$\delta^{15}N$値を調べたところ、イチゴ果実の$\delta^{15}N$値は施肥の影響を受け、有機肥料区＞無肥料区＞化学肥料区の順となった。④トマトの$\delta^{15}N$値に及ぼす肥料および土壌窒素の影響についての各地での比較試験を行ったところ、11土壌の$\delta^{15}N$値は＋5.9～＋12.3‰(平均＋9.4‰)の範囲であり、差があった。果実の$\delta^{15}N$値について、化学肥料区と有機肥料区を比較すると、有機肥料区が化学肥料区よりも高い値であった。果実の$\delta^{15}N$値は、区に係わらず試験地毎の変動が大きいことが示された。$\delta^{15}N$値の変動幅は、無肥料区で14.6‰、化学区で11.1‰、有機区で13.0‰と、大き

な値でかつ相互に大きな差異は認められず、どの試験地でも果実の $\delta^{15}N$ 値は土壌窒素の $\delta^{15}N$ 値によって大きく影響を受けていたことを示している。

12)①XRF-EDS に Cd 用フィルター装着を行ったが、検出限界は 7 ppm であった。しかし、XRF-WDS においてX線発生源を強力化すれば、0.1ppm オーダーの分析が可能となることが明らかとなった。②SEM-EDS によりコメ粒での詳細な元素分布が判明し、元素の偏在性が明瞭に観察された。コメ粒に、Zn と Cd とが共存する分布域が見出されたが、Cd が Zn と同じ12族元素であるために同一挙動を示すことが原因と考えられる。コメ粒形成時の還元環境では、12族元素は硫化物、硫酸塩等の S を有するサイトとの結合により固定されやすい。したがって、コメ粒では周辺部に S が分布するために、そこに微量の Zn が存在し、Cd も共存するといえる。さらにコメ粒では、O と S との分布には逆相関関係が認められ、中心部に O、外縁部に向かい S が分布することが判明した。③各種重金属は、開花期以後、とくに水分が必要な時期に、籾等を通して糠が形成される際にコメ外縁部に集積することが明らかとなった。食品成分表(四訂)による Zn 含有量データは、糠においてタンパク質以外との結合の存在可能性を示唆している。

Ⅶ　今後の課題

1　トレーサビリティ・品質表示の裏付けとなる研究開発

(1) ユビキタスによる食農情報提供技術の開発

識別子の付与に手間とコストをかけない手法を開発する必要がある。IC タグを使ったシステムも導入に際してのコストが大きな課題である。また、識別子の供給方法もオンデマンドで対応できるようにする必要がある。米に関しては、どういった情報が本当に必要とされているのかを実証試験を通じて引き続き確認していく必要がある。POS に関しては、顧客管理システム（会員システム）と SEICA による POS システムを組み合わせ、顧客個別の購買傾向の把握、および、生産者と顧客とのコミュニケーションにより信頼性確保が実現できるシステムへ発展させる必要がある。

(2) 農産物の品種判別技術の開発

品種判別の困難な加工食品に対応が可能な品種判別用マーカー（SSR, SNP, 品種固有マーカー等）を開発する必要がある。農産物の原産地判別技術を確立し、外国産農産物の国産農産物偽装表示を抑制する技術を開発する必要がある。また、農産物の流通の国際化に伴い、国際基準の分析技術の開発と試験室間共同試験を実施する必要があり、分析法の国際化に対応した分析手法を構築し、妥当性の確認試験に取り組むことが必要である。

(3) 畜産物品種・個体判別技術の開発

ウシについては、国内産牛の品種鑑定法開発に成功し、今後は、輸入牛肉の大部分を占めるオーストラリア産牛肉およびアメリカ産牛肉を対象とした DNA 鑑定法の開発を行う必要がある。ブタにおいては、各地において特徴ある豚系統、即ち銘柄豚の系統造成とその食肉としての販売が行われていることから、大量の SNP 遺伝子座を開発するとともに、品種銘柄豚等における分布および頻度を検出し、ブタの識別に有用な SNP 等のマーカー情報を提供するデータベースの構築を行い､様々な品種･銘柄豚の識別に対応できる DNA マーカーの開発を行う必要がある。ニワトリについては、特定の品種・系統だけでなく、特定の飼養などを行ったニワトリ集団を、畜産物段階で識別できるシステムを構築する必要がある。開発された識別方法については、分析法をマニュアル化しその妥当性を検証する必要がある。

(4) 食品の生産・流通履歴の迅速検証技術の開発

魚介類の凍結履歴の判定技術では魚の保存条件・解凍条件等外乱の近赤外スペクトルに及ぼす影響を解明する必要がある。養殖魚判別技術では精度を高めるため脂肪酸のデータの蓄積が必要である。放射線照射肉類の検出技術では食肉以外への応用拡大が必要である。残留農薬簡易迅速測定システムの開発では現場への普及を図るため民間との共同による専用器の開発が必要である。

2　食品の安全性に関するリスク分析確立のための研究開発

(1) 最近判明したリスクの解明と制御およびコミュニケーション

日本における食品中のアクリルアミドに関するリスク管理のために、分析技術の信頼性確保を目的に、日本型加工食品のアクリルアミド分析標準物質の開発を行う必要がある。また、日本におけるトータルダイエットスタディにより、日本人のアクリルアミドの経口摂取量推定を行う必要がある。加工・調理食品中のアクリルアミド低減のためには、本プロジェクトで得られた作物成分とアクリルアミド生成に関する知見を生かして、アクリルアミド低生成型品種・系統の選抜を試みる必要がある。バレイショに関しては、所定貯蔵温度への緩慢低下など、還元糖量の増加を抑制できる原料イモのハンドリング法の検討など、原料イモ貯蔵技術の改良が必要である。茶に関しては、アスパラギンが少ない原料茶葉を用いることと、製茶品質を落さずアクリルアミドの生成を抑えた焙煎方法を開発することが必要である。スギヒラタケに関しては、毒本体を完全に精製し、構造、作用機構を明らかにする必要がある。「将来の社会的不安」の高い「ハザード」については、今後、リスクコミュニケーションによって社会的議論を深めていく必要がある。また、食品事業者等、消費者以外の重要な食品安全に関わる利害関係者に対しても意識調査を行う必要がある。

(2) 食品衛生管理における有害微生物の増殖予測・検出技術の開発

微生物センサーは、実用化可能なレベルに達しているが、実際の実用化のためには、種々の食品を用いた実証試験の積み重ねによる改良とコストのさらなる低下が課題である。開発した有害微生物の迅速検出技術の優秀性は明らかとなったが、実用化に向けた検討が今後の課題である。開発した汚染微生物増殖予測システムの実際食品での実証試験が衛生管理への導入のためには必要である。

(3) 食品衛生管理のための有害微生物制御技術の高度化

微生物制御技術の開発は、各食品製造工程の改善や新規食品に対応した最終食品の安全性確保に対して重要な課題であり、常に技術開発を進める必要がある。本中課題において実施してきた課題には、基礎的な検討から効果的成果を見出し、既に実用化を進めている課題もある。これらについても実際の実用化にあたり、殺菌処理量のスケールアップに対しての最適化などの課題について検討する必要がある。他の課題については、研究開始年度が新しく、基礎的な検討を終えて、実用的な衛生的管理工程の構築に寄与すると思われる課題が多く出てきており、これらの課題については、より食品製造工程の現場に対応した微生物制御試験の実施と効果の確認、実用化レベルでの適用可能な最適条件の策定などの課題があり、引き続き研究開発を実施していく必要がある。

(4) 天然毒素等の汚染実態調査及び検出技術の高度化

マイコトキシン分析法に関しては, LC-MS/MS 等の最新分析機器を応用した、高精度な網羅的検出法の検討を進める必要がある。また、現場でのスクリーニングに対応するため、精度は若干落ちても、スループットの高い簡易検査法の開発も必要である。さらに、信頼できるデータを得るためには、分析法の信頼性が重要であり、分析法の開発にあたってはそのバリデーションが重要である。

マイコトキシンのリスク分析にあたっては、マイコトキシンの毒性作用に関する情報の蓄積が必須である。マイコトキシンの毒性に関する論文報告は膨大であるが、未だ十分とはいえない。特にトリコテセンマイコトキシンについては、複数のトリコテセンマイコトキシンによる同時汚染の可能性もあり、トリコテセンマイコトキシンの共同作用についても解析が必要である。

生産・流通段階でのマイコトキシン汚染を防御することも重要な課題である。圃場での赤かび病発生を防ぐ方法、果物の青かび病の発生を防御する方法、アフラトキシンの再生を防御する方法等については、その実用化を目指した検討が今後も必要である。

(5) 栽培技術等による赤かび病かび毒のリスク低減技術の開発

日本産 *F. avenaceum* には 4 つの内部系統群の存在が明らかとなり、分類学的な再考察が必要である。かび毒を不活性化・解毒する遺伝子をイネに導入することは成功したので、今後はムギ類への導入が必

要となる。定量 PCR を用いたかび毒簡易定量技術を開発するには、環境条件の影響を反映する遺伝子領域を見出し、遺伝子定量して得られた数値を毒素産生性と一致させる補正が必要である。赤かび病菌の菌種・毒素産生型等について日本全体のマクロ的な状況を明らかにすることができたので、局所の菌集団の年次変動に焦点をあてることでミクロ的な状況を明らかにする必要がある。色彩選別機に関しては、紫外光域の利用および透過光を用いた内部品質による選別について検証するとともに、各波長を組み合わせた最適な選別方法を確立する必要がある。北海道では現在の品種より抵抗性が付与されたコムギ品種が普及する見込みであり、品種の抵抗性に対応したかび毒汚染対策について検討する必要がある。これまで北日本を中心に行ってきたイネ赤かび病の発生実態を全国規模で明らかにするとともに関与する菌種を同定する必要がある。ブームスプレーヤ及びラジコンヘリによる薬剤少量散布の現場での使用には新たな農薬登録が必要であり、今後更なる試験が必要である。自然発病圃場の毒素分布にはバラツキが大きく、そこに存在する赤かび病菌の遺伝的多様性が高い事例が示されたが、1 圃場の毒素濃度を調査ために必要なサンプリング面積を決定するには試験事例を重ねる必要がある。防除薬剤技術についてはかび毒低減効果をエンドポイントとした散布適期について早急に明らかにする必要がある。赤かび病発生予測モデルを実用的にするには、出穂・開花期予測モデルと発生予測モデルを組み合わせる必要がある。また、気象データ取得元として、各圃場ごとに設置できるフィールドサーバの利用なども検討していく必要がある。品種のかび毒蓄積性に関してはその定義と評価方法の統一が必要である。防除薬剤の散布によるかび毒蓄積量の増大は、農薬の環境影響に関して新たな問題を提起している。本研究において、その原因を究明することは出来なかったが、食の安全確保のためには、今後更なる原因究明が必要である。北海道の主要品種間では、かび毒産生量の経時的変化に違いがみられたため、かび毒の蓄積部位および蓄積機構の違いについて引き続き調査する必要がある。品種のかび毒蓄積特性をより正確に評価するには、さらに年次を重ねて試験を行う必要がある。

3　世界的に信頼される分析データ提供システム等の基盤構築

(1) 国際基準に則った食品の安全性保証システムの構築

1) 分析の信頼性を向上させていくには、試験方法の開発と並んで、種々の品質管理が必要であり、より実際的な PT（コメを試料としたものなど）が必要である。コメをマトリックスとした分析法が国際的にはほとんどない中で、国民の食料の安全性確保の面からも、コメを対象マトリックスとした種々の有害物質に対する分析法の開発と妥当性確認が必要である。また、試料調製（サンプル調製）に関してより厳密な検討が必要である。

2) 外部精度管理調査の単回の実施ではあくまでも特定の時期における検査機関の精度を示しているにすぎない。検査機関における信頼性確保のための外部精度管理調査は継続的に実施する必要があるものと考えられる。また、これまでの調査結果の解析では平均値と標準偏差を用いた従来法により実施してきたが、国際基準を考慮したいわゆる FAPAS 法によるロバストな解析についても実施する必要がある。さらに、これまでに使用した小麦試料の内部精度管理用試料としての可能性についても検討を加える必要があるものと考えられた。

3) さらなる簡易な同定法や特異的検出への応用を検討するため、各種において特異的プライマーを設計し、PCR 法による直接検出の開発を次期プロジェクトで試みる。今後、疫学調査を行うためには連携機関などを通じて、さらなる菌株コレクションの取得およびデータ収集を行う必要がある。

4) 動物個体を用いた有害物質吸収評価は様々な面から制約が多く、細胞培養系を用いた評価系の意義は大きいが、腸管細胞層のみの評価は、生体における吸収の 1 過程を見ているに過ぎず限界がある。両者のギャップを埋めるような評価系の構築が課題である。また、細胞実験系は細胞の培養条件、使用試薬（血清等）のロット、実験者などによって実験値が大きく変動しがちである。より再現性の良い実験系の構築も検討する必要がある。

カドミウムにより Caco-2細胞の IL-8産生が誘導されるという *in vitro* 実験の結果が、マウスを用いた実験でも再現されたことから、*in vitro* 実験系の有用性が示された。また、ダイオキシン類により腸管

上皮細胞の解毒酵素発現が上昇するという *in vitro* 実験の結果を、*in vivo* 系（マウス）を用いて検討中であるが、このような *in vitro, in vivo* 両実験系の相関性を、さらに多くの事例で確認していくことも重要な課題である。

5) 今回得られた結果を基に多元素同時分析法を進め、植物のイオノーム分析から植物への微量元素の蓄積動態とゲノムとの関係を調べていきたい。

6) メバチ、クロマグロは消費量も多く水銀レベルが高く、特に大型魚の水銀レベルは個体差が大きい。迅速で安価な水銀分析法が開発されれば、マグロ類にも Codex ガイドライン値（メチル水銀 1 ppm）を適用し、規制値を超える魚を流通させない措置が可能となる。ICP-MS によるカドミウム分析システムの構築により、カドミウム含量が高い魚類肝臓、無脊椎動物等のカドミウム含量、およびカドミウム含量の低い魚肉中の正確な定量等、暴露評価に資する基礎データを蓄積する。水銀結合性タンパク質を動物試験用に大量に調製し、これを用いた毒性評価を行う。

7) 諸外国の調査などからも鉛の摂取は主に野菜等の農産物からとされており、農林水産省でも農産物の調査が行われたが、安全を確認するためにも、魚介・肉・卵および乳幼児で摂取量が多い乳類等の調査も重要と考えられる。

8) 理化学的フィンガープリントは、今回の産地判別には不適当であったが、対象とする米試料の食味評価や利用適性の推定には有用な手段である。同一品種の原種同士の DNA 塩基配列の相違に基づく PCR 法は原理的な識別可能性が明らかにされた。同一品種の同質遺伝子系統の DNA 塩基配列の相違に基づく PCR 法は明瞭な識別性が認められたので、平成17年度から BL に全面作付け転換を行う新潟県産コシヒカリを対象に、実用的な判別キットの開発に取り組む。

9) プライマーセットの改良、試験マニュアルの改良等により、試験室間共同試験結果の改善を図る。

10) 本法はイチゴの果実、生葉など未加工のサンプルにしか適用が確認されていない。生鮮果実に次いで商品性の高いジャム等の加工品では、現時点では品種識別法が確立されておらず、今後の課題となっている。室間共同試験 では、25のマーカーのうち15マーカーでの妥当性が確認されたが、残り10マーカーについては未検証である。

11) 有機物を施肥した農産物かどうかの判別方法については、本課題の一連の研究により、基準となる値を提示できた。今後は、施肥履歴全般についても推定ができるシステムを構築する必要がある。今後、このような施肥履歴全般についての結果を集積し、一般に使用されるように判別ソフトウエアも開発する必要がある。さらに、開発した窒素安定同位体比の指標と従来用いられてきた微量元素による原産地判別に関する判別指標を複合的に活用した新たな指標およびソフトウエアの開発により、さらなる高度施肥履歴・原産地の偽装判別を可能とする必要がある。これらの履歴に関する科学的な情報は、消費者が農産物を選択するための情報として活用されるよう、これらの考え方等を普及していく必要がある。

12) 糠及びコメ粒内における Cd 等の重金属元素は異なる化合物として存在するため、XRF-WDS において10kW 程度の X 線源を用いれば定性・定量が可能となる。このことから今後、分析迅速性を念頭において、強力 X 線源を用いた実験室用汎用型波長分散型蛍光 X 線分析装置の開発が必要である。また、土壌からコメへの重金属移行を最小限におさえるためには、コメ形成時期における重金属元素濃集機構の解明を進め、施肥・資材投与の適期について研究を推進することが不可欠である。

Ⅷ　研究発表

1 トレーサビリティ・品質表示の裏付けとなる研究開発

(1) ユビキタスによる食農情報提供技術の開発

1) 杉山純一. 2005. 青果ネットカタログ「SEICA」の展望. システム農学. 21(3):149-155.

2) 杉山純一・牛腸奈緒子・白井敏樹・宇田渉. 2005. 実用的なトレーサビリティ技術の開発. 日本食品科学工学会第52回大会要旨集. 150.

3) 杉山純一. 2005. 信頼確保のためのトレーサビリティ.「食品鑑定技術ハンドブック」. 株式会社サイエンスフォーラム. 365-375.

4) 杉山純一. 2005. 食品・農産物におけるトレーサビリティの最新技術. 食品機械装置. 42:56-62.

5) 杉山純一. 2005. 農産物トレーサビリティシステムの現状と実用化事例. 今月の農業.

49(8):17-22.
6) 杉山純一・宇田渉. 2005. Windows システム拡充プロジェクト. 月刊ウィンドウズデベロッパーマガジン. 10月号. 18-21.
7) 杉山純一. 2005. 農業・食品分野における情報産業の創出. 月刊フードケミカル. 22(1):59-64.
8) 杉山純一. 2006. 誰でも簡単に取り組める「SEICA」情報とはどんなものか. フレッシュフードシステム. 35(1):7-12.

(2) 農産物の品種判別技術の開発
1) 飯塚弘明ら2005. コンニャクにおける RLGS 品種識別マーカーの開発. 日本 DNA 多型学会 第14回学術集会抄録集.: 78 (11月24～25日、前橋市群馬会館).
2) 奥泉久人ら 2005. イグサ品種の DNA 多型マーカーの開発. DNA 多型. 13: 77-79.
3) Fukuoka, H. *et al.* (2005) read2Marker : a data processing tool for microsatellite marker development from a large data set. *BioTechniques*. 39 : 472-476.
4) 藤田由美子ら(2005) 小麦加工食品の原料品種判別法の開発 Ⅰ. 加工食品からの DNA 抽出法および DNA 断片化程度の評価. 育種学研究7 (別1・2号) : 909.
5) 池田達哉ら(2005) 小麦品質改良のための種子貯蔵蛋白質遺伝子の研究 VII. 低分子量グルテニン・サブユニット遺伝子型の分類とその DNA マーカー化. 育種学研究7 (別1・2号) : 255.
6) 本田雄一・太田尊士・三木哲弘・多田伸司 2002. 小麦新品種「さぬきの夢2000」の育成. 香川県農業試験場研究報告. 55:1-8.
7) 大麦加工品に適用可能な CAPS マーカーの開発 柳澤貴司・池田達哉・高山敏之 2005 育種学研究 7(別1, 2):465
8) Wang ら 2004. The development of SSR markers by a new method in plants and their application to gene flow studies in azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi]. *Theor Appl Genet* 109: 352-360.
9) 紙谷元一・竹内徹・楠目俊三 2004. DNA 多型による白インゲン豆品種「雪手亡」の識別. 育種学研究. 6:29-32.
10) 紙谷元一 2004. インゲンマメ子実からの品種識別ー登録品種「雪手亡」の識別について. 農業および園芸. 79. 185-189.
11) Haishima, M. Kato, J. and Ikehashi, H. 1993. Isozyme polymorphism in native varieties of Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.). *Japan J. Breed.* 43:537-547
12) 塚崎光・小原隆由・若生忠幸・山下謙一郎・小島昭夫 2004. 春まきネギの初期生育に関する QTL 解析. 育種学研究6(別2):280
13) 福岡浩之 2004. 野菜の DNA 品種識別法確立に向けての技術的問題点とその方策農及園. 79: 175-179.
14) 古川 真・谷本 秀夫・橘田 浩二・西岡 輝美. 2006. ハクサイ加工品 (キムチ) の材料品種判別における SSR マーカーの利用. 園芸学会雑誌. 75別1 : 422.
15) 谷本 秀夫・古川 真・布目 司・福岡浩之. 2005. SSR マーカーによるナス品種識別法の開発. 園芸学会雑誌. 74別1 : 197.
16) 中野明正・上原洋一・渡邊 功 2002. 有機農産物認証を受けた果菜類の $\delta^{15}N$ 値. 日本土壌肥料学雑誌. 73:307-309
17) 中野明正・上原洋一 2004. 有機肥料で栽培した野菜と化学肥料で栽培した野菜とを判別する基準としての窒素安定同位体比の適用. 野菜茶業研究所研究報告. 3. 119-128
18) Kimura, T. et al. 2002. Identification of Asian pear varieties by SSR analysis. *Breed Science* 52: 115-121.
19) 木村鉄也ら. 2002. SSR マーカーを用いたナシの親子鑑定と親の推定. DNA 多型. 10:48-51.
20) Yamamoto, T. et al. 2003. Parentage analysis in Japanese peaches using SSR markers. *Breeding Science* 53: 35-40.
21) 山本俊哉ら. 2003. モモのゲノム解析―SSR マーカーの開発と品種識別―. DNA 多型. 11: 61-64.
22) 小野勇治ら 2003a. SSR マーカーによるモモの品種識別と親子鑑定. 園学雑. 72(別1):14
23) 小野勇治ら 2004a. SSR マーカーによるモモの品種識別と親子鑑定 その2 育成品種・系統の解析. 園学雑. 73 (別1) :182
24) 野村和希・清水徳朗・藤井浩・島田武彦・遠藤

朋子・木村鉄也・山本俊哉・大村三男 2006. カンキツ乾燥果皮及び果汁からの DNA 抽出法の改良と Taqman プローブによる品種判別. 園学雑 75（別１）:293.
25) 藤井浩・池谷祐幸・緒方達志・島田武彦・遠藤朋子・清水徳朗・大村三男 2005. 共優性マーカーと優性マーカーの混在下での品種判別のための最少マーカーセット選択法. 園学雑. 74（別2）: 281.
26) 木村鉄也、小曽納雅則、壽 和夫、林 建樹、伴 義之、山本俊哉（2003）. ナシ果実及び加工品の DNA 分析 I. 生果実、乾燥果実、 缶詰からの DNA 抽出. 園芸学雑誌 第72巻 別(2)252.
27) 木村鉄也、小曽納雅則、林 建樹、伴 義之、山本俊哉（2004）. ナシ果実及び加工品の DNA 分析 III. SSR 分析による生果実、乾燥果実、缶詰からの品種同定. 育種学研究 第6巻 別(1)102.
28) 馬場崎勝彦、宮崎安将、宮崎和弘 2003. 輸入乾・生シイタケの系統判別. 特産情報. プランツワールド. 42-45
29) 馬場崎勝彦 2005 きのこの原産地判別で指標となる品種情報をデータベース化. TechnoInnovation. STAFF. 56：44-45
30) Tahara, M., Aoki, T., Suzuka, S., Yamashita, H., Tanaka, M., Matsunaga,, S. Kokumai, S. 2004. Isolation of an active element from a high-copy-number family of retrotransposons in the sweetpotato genome. *Mol. Gen. Genomics*.：272：116-127.
31) Yamashita H, Tahara M. 2006. A LINE-type retrotransposon active in meristem stem cells causes heritable transpositions in the sweet potato genome. *Plant Mol.* Biol.:61:79-94.

(3) 畜産物品種・個体判別技術の開発

1) Bosak, N., Faraut, T., Mikawa, S., Uenishi, H., Kiuchi, S., Hiraiwa, H., Hayashi, T. and Yasue, H.. 2003. Construction of a high-resolution comparative gene map between swine chromosome region6q11→q21 and human chromosome 19q-arm by RH mapping of 51 genes. *Cytogenet. Genome Res.* 102:109-115.
2) Harumi, T., Sano, A., Kagami, H., Tagami, T., Matsubara, Y. and Naito, M..2004. Polymerase chain reaction detection of single nucleotide polymorphisms in the chicken mitochondrial D-loop region. *Animal Science Journal.* 75:503-507.
3) Hiraiwa, H., Sawazaki, T., Suzuki, K., Fujishima-Kanaya, N., Toki, D., Ito, Y., Uenishi, H., Hayashi, T., Awata, T. and Yasue, H.. 2003. Elucidation of correspondence between swine chromosome 4 and human chromosome 1 by assigning 27genesto the ImpRH map, and development of microsatellites in the proximity of 14genes. *Cytogenet. Genome Res.* 101:84-89.
4) Ihara, N., Takasuga, A., Mizoshita, K., Takeda, H., Sugimoto, M., Mizoguchi, Y., Hirano, T., Itoh, T., Watanabe, T., Reed, K.M., Snelling, W.M., Kappes, S.M., Beattie, C.W., Bennett, G.L. and Sugimoto, Y.. 2004. A com-prehensive genetic map of the cattle genome based on 3,802 microsatellites. *Genome Res.* 14:1987-1998.
5) Fujishima-Kanaya, N., Toki, D., Suzuki, K., Sawazaki, T., Hiraiwa, H., Iida, M., Hayashi, T., Uenishi H., Wada Y., Ito Y. and Awata T.. 2003. Develepment of 50 gene-associated microsatellite markers using BAC clones and the construction of a linakge map of swine chromosome 4. *Anim. Genet.* 34:135-141.
6) Mannen, H., Morimoto, M., Oyama, K., Mukai, F. and Tsuji, S.. 2003. Identification of mitochondrial DNA substitutions related to meat quality inJapanese Black cattle. *Journal of Animal Science.* 81:68-73.
7) Mannen, H., Kohno, M., Nagata, Y., Tsuji, S., Bradley, D.G., Yeo, J.S., Yamsamba, D., Zagdsuren, Y., Yokohama, M., Nomura, K. and Amano, T.. 2004. Independent Mitochondrial Origin and Historical Genetic Differentiation of NorthEastern Asian Cattle. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32:539-544.
8) Nakamura A., Kino, K., Minezawa, M., Noda, K. and Takahashi, H.. 2006. A method for discriminating a Japanese chicken, the Nagoya breed, using Microsatellite markers. *Poultly Sci.* in press.
9) 長坂直比路・峰澤満・高橋秀彰. マイクロサテ

ライト DNA 多型による土佐地鶏の遺伝的多様性の解析．日本家禽学会2005年度秋季大会 講演要旨集 I－11.

10) Okumura, N., Hayashi, T., Sekikawa, H., Matsumoto, T., Mikawa, A., Hamasima, N., and Awata, T.. 2005. Sequencing, mapping and nucleotide variationof porcine coat colorgenes EDNRB, MYO5A, KITLG, SLC45A2, RAB27A, SILV and MITF. *Animal Genetics*. 37(1):80-82.

11) 奥村直彦・新居雅宏・濱島紀之．2005．ブタ(Sus scrofa)におけるアグチ遺伝子(ASIP)の発現．日本畜産学会報． 76(3):285-294.

12) Okumura, N., Hayashi, T., Sekikawa, H., Matsumoto, T., Mikawa, A., Hamasima, N. and Awata, T.. 2005. Sequences and mapping of genes encoding porcine tyrosinase (TYR) and tyrosinase-related proteins (TYRP1 and TYRP2). *Animal Genetics* 36:513-516.

13) Okumura, F., Shimogiri, T., Shinbo, Y., Yoshizawa, K., Kawabe, K., Mannen, H., Okamoto, S., Cheng, H. H. and Maeda, Y.. 2005. Linkage mapping of four chicken calpain genes. *Anim. Sci.* J. 76:121-127.

14) Osman, SAM, Sekino, M., Nishibori, M., Kawamoto, Y., Kinoshita, Y., Yamamoto, Y. and Tsudzuki, M.. 2004. Genetic variability and relationships of Japanese native chickens assessed by means of microsatellite profiling approach-focusing on the Oh-Shamo (Japanese Large Game) and its related breeds. *J. Poult. Sci.* 41:94-109.

15) Osman, SAM, Sekino, M., Nishibori, M., Yamamoto, Y. and Tsudzuki, M.. 2005. Genetic variability and relationships of Japanese native chickens assessed by means of microsatellite profiling approach-Focusing onthe breeds established in Kochi Prefecture, Japan. Asian-Aust. *J. Anim. Sci.* 18:755-761.

16) Osman, SAM, Sekino, M., Kuwayama, T., Kinoshita, K., Nishibori, M., Yamamoto, Y. and Tsudzuki, M.. 2006. Genetic variability and relationships of native Japanese chickens based on microsatellite DNA polymorphisms-Focusing on the Natural Monuments of Japan. *J. Poult. Sci.* 43:12-22.

17) Osman, SAM, Sekino, M., Nishihata, A., Kobayashi, Y., Takenaka, W., Kinoshita, K., Kuwayama, T., Nishibori, M., Yamamoto, Y. and Tsudzuki, M.. 2006. The genetic variability and relationships of Japanese and foreign chickens assessed by microsatellite DNA profiling. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 19:in press. 力丸宗弘・峰澤満・石条次・高橋秀彰．マイクロサテライト DNA 多型を用いた比内鶏の遺伝的多様性の調査．日本家禽学会2005年度秋季大会 講演要旨集 I－10.

18) Sasazaki, S., Itoh, K., Arimitsu, S., Imada, T., Takasuga, A., Nagaishi, H., Takano, S., Mannen, H. and Tsuji, S.. 2004. Development of Breed Identifica-tion Markers derived from AFLP in beef cattle. *Meat Sci.* 67:275-280.

19) Sasazaki, S., Imada, T., Mutoh, H., Yoshizawa, K. and Mannen, H.. 2006. Breed discrimination using DNA Markers derived from AFLP in Japanese Beef cattle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 19:1106-1110.

20) 佐藤洋一・鈴木暁・安田潤平・福成和博・吉川恵郷．2005．日本短角種に適したDNA個体識別マーカーセットの構築．第55回 東北畜産学会大会 口頭発表.

21) Shinkai, H., Tanaka, M., Morozumi, T., Eguchi-Ogawa, T., Okumura, N., Muneta, Y., Awata, T. and Uenishi, H.. 2006. Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2, TLR4, TLR5, and TLR6 genes. *Immunogenetics*. 58:324-30.

22) Takahashi, H., Tsudzuki, M., Sasaki, O., Niikura, J., Inoue-Murayama, M. and Minezawa, M.. 2005. A chicken linkage map based on microsatellite markers genotyped on a Japanese Large Game and White Leghorn cross. *Anim. Genet.* 36:463-7.

23) Tanaka, M., Matsumoto, T., Yanai, S., Domukai, M., Toki, D., Hayashi, T., Kiuchi, S., Yasue, H., Uenishi, H., Kobayashi, E. and Awata, T.. 2003. Conser-vation of the syntenies between porcine chromosome 7 and human chromosome 6,

14 and 15 demonstrated by radiationhybrid mapping and linkage analysis. *Anim. Genet.* 34:255-263.
24) Tanaka, M., Ando, A., Renard, C., Chardon, P., Domukai, M., Okumura, N., Awata, T. and Uenishi, H.. 2005. Development of dense microsatellite markers in the entire SLA region and evaluation of their polymorphisms in porcine breeds. *Immunogenetics*. 57:690-696.
25) Tsuji, S., Mannen, h., Mukai, F., Shojo, M., Oyama, K., Kojima, T., Kano, C., Kinoshita, Y. and Yamaguchi, E.. 2004. Trace of native cattle in Japanese Holstein assessed by mitochondrial DNA sequence polymorphism. *Journal of Dairy Science*. 87:3071-3075.
26) Tsuji, S., Itoh, K., Sasazaki, S., Mannen, H., Oyama, K., Shojo, M. and Mukai, F.. 2004. An association study using AFLP markers and application to a beef cattle breeding population. *Animal Genetics*. 35:40-43.

(4) 食品の生産・流通履歴の迅速検証技術の開発

1) 齋藤洋昭 2004. 食物連鎖からみた水産脂質. 平成16年度水産学会春季大会要旨集. 328.
2) 齋藤洋昭 2004. 食物連鎖における水産脂質の動態. 水産機能性脂質－給源・機能・利用－. 高橋是太郎編. 日本水産学会監修. 恒星社厚生閣. 9-27.
3) 齋藤洋昭 2005. 付加価値の高い養殖魚. 養殖. 緑書房. 42. 88-91.
4) 齋藤洋昭 2006. 天然・養殖の判別：ヒラメにおける考察. 第9回マリンバイオテクノロジー学会大会要旨集. 100.
5) S.Saranwong and S. Kawano 2005. Rapid determination of fungicide contaminated on tomato surface using DESRI-NIR Spectroscopy: a system for ppm-order concentration, *J. Near Infrared Spectrosc.*, **13**, 169-175
6) 等々力節子・杉山純一・宇田渉・吉本英治 2004 DNA コメットアッセイによる放射線照射食肉の検知. 食品成果情報第16号：26-27。
7) Uddin, M., and E. Okazaki 2004. Classification of fresh and frozen-thawed fish by near-infrared spectroscopy. *J. Food Sci.* 69(8): C665-668.
8) Uddin, M., E. Okazaki, S. Turza, Y. Yamashita, M. Tanaka, and Y. Fukuda 2005. Non-destructive visible/NIR spectroscopy for differentiation of fresh and frozen-thawed fish. *Food Chem.* 70(8): C506-510.

2 食品の安全性に関するリスク分析確立のための研究開発

(1) 最近判明したリスクの解明と制御およびコミュニケーション

1) Yoshihiro Chuda・Hiroshi Ono・Hiroshi Yada・Akiko Ohara-Takada・Chie Matsuura-Endo・Motoyuki Mori. 2003. Effects of Physiological Changes in Potato Tubers (*Solanum tuberosum* L.) after Low Temperature Storage on the Level of Acrylamide Formed in Potato Chips. *Bioscence, Biotechnology, and Biochemistry.* 67: 1188-1190.
2) 遠藤千絵・高田明子・小林晃・津田昌吾・瀧川重信・野田高広・森元幸・忠田吉弘・小野裕嗣・箭田浩士・吉田充 2006. ばれいしょ加工時のアクリルアミド生成に関わる要因 平成17年度新しい研究成果－北海道地域－. 129-131.
3) Chie Matsuura-Endo・Akiko Ohara-Takada・Yoshihiro Chuda・Hiroshi Ono・Hiroshi Yada・Mitsuru Yoshida・Akira Kobayashi・Shogo Tsuda・Shigenobu Takigawa・Takahiro Noda・Hiroaki Yamauchi・Motoyuki Mori. 2006. Effects of Storage Temperature on the Contents of Sugars and Free Amino Acids in Tubers from Different Potato Cultivars and Acrylamide in Chips. *Bioscence, Biotechnology, and Biochemistry.* 70: 1173-1180.
4) Yuzo Mizukami・Katsunori Kohata・Yuichi Yamaguchi・Nobuyuki Hayashi・Yusuke Sawai・Yoshihiro Chuda・Hiroshi Ono・Hiroshi Yada・Mitsuru Yoshida. 2006. Analysis of Acrylamide in Green Tea by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:7370-7377.
5) 中野敦博・清水英樹・田中常雄・高田明子・遠藤千絵・森元幸 2005. アクリルアミド生成を抑制するポテトチップ製造法. 平成16年度新しい研究成果－北海道地域－. 178-180.
6) Akiko Ohara-Takada・Chie Mastuura-Endo・Yoshihiro Chuda・Hiroshi Ono・Hiroshi Yada・Mitsuru Yoshida・Akira Kobayashi・Shogo Tsuda・Shigenobu

Takigawa・Takahiro Noda・Hiroaki Yamauchi・Motoyuki Mori. 2005. Change in Content of Sugars and Free Amino Acids in Potato Tubers under Short-Term Storage at Low Temperature and the Effect on Acrylamide Level after Frying. *Bioscence, Biotechnology, and Biochemistry.* 69: 1232-1238.

7) 奥野成倫・石黒浩二・吉元誠・甲斐由美・小野裕嗣・箭田浩士・吉田充・忠田吉弘 2006. サツマイモ塊根加熱時のアクリルアミド生成量. 平成17年度研究成果情報（九州地域・全文版）第21号 513-514.

8) Sigenori Okuno・Koji Ishiguro・Makoto Yoshimoto・Hiroshi Ono・Yoshihiro Chuda・Hiroshi Yada・Mitsuru Yoshida・Yumi Kai. 2007. Relationships between Acrylamide Formed during Heating and Components of Sweetpotato Roofs. Sweetpotato Research Front 21:3.

(2) 食品衛生管理における有害微生物の増殖予測・検出技術の開発

1) Kawamoto, S., Kawasaki, S., Bari, M. L., Inatsu, Y., Kogure, H., Kawasaki, S., Nakajima, K., Sakai, N., and Futase, K. 2004. Development of a novel microbial sensor for monitoring temperature changes of food. Proceedings p39-47, 33nd UJNR Food and AgriculturePanel Meeting, Hawaii, USA.

2) Kogure, H., Kawasaki, S., Nakajima, K., Sakai, N., Futase, K., Inatsu, Y., Bari, M. L., Isshiki, K., and Kawamoto, S. 2005. Development of a novel sensor with baker's yeast cells for monitoring temperature control during cold food chain. *J. Food. Prot.*, **68** (No. 1):182-186.

3) 川本伸一 2005. 食品の温度管理不備を検知する微生物センサーの開発, 食品工業, **48** (No. 10):40-48.

4) Hara-Kudo Y, Sugiyama K, Nishibuchi M, Chowdhury A, Yatsuyanagi J, Ohtomo Y, Saito A, Nagano H, Nishina T, Nakagawa H, Konuma H, Miyahara M, Kumagai S. 2003. Prevalence of Pandemic Thermostable Direct Hemolysin-Producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Seafood and the Coastal Environment in Japan. *Appl Environ Microbiol.* **69**: 3883-3891.

5) Nishina T., Wada M., Ozawa H., Hara-Kudo Y, Konuma H., Hasegawa J., Kumagai S. 2004. Growth kinetics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 under varyingconditions of pH, NaCl concentration and temperature. 2004. *J Food Hyg. Soc. Jpn.* **45**:35-37.

6) 小西典子, 尾畑浩魅, 八木原怜子, 下島優香子, 柴田幹良, 畠山 薫, 鈴木 浩, 池内容子, 秋場哲哉, 門間千枝, 矢野一好, 甲斐明美, 諸角 聖 2005. 東京湾の海水, 海泥および貝からの病原ビブリオの検出と分離された腸炎ビブリオ菌株の諸性状, 日本食品微生物学会誌, **22**(4): 138-147

7) .尾畑浩魅, 下島優香子, 小西典子, 柴田幹良, 門間千枝, 藤川浩, 矢野一好, 甲斐明美, 諸角聖 2006. 腸炎ビブリオ食中毒事例におけるPCR法を用いた食品からの耐熱性溶血毒（TDH）産生菌の分離, 感染症学雑誌, **80**:383-389.

8) 葛西 慶明・木村 凡・藤井 建夫. 2005. m-RNA のリアルタイム PCR 定量による *Clostridium botulinum* type A における毒素遺伝子の発現解析. 第26回日本食品微生物学会学術総会講演要旨.

9) Kasai, Y., Kimura, B., Kawasaki, S., Fukuya, T., Sakuma, K., and Fujii, T. 2005. Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in steamed rice aseptically packed under modified atmosphere. *J. Food Protect.* **68**(5) 1005-1011.

10) 横山敬子、高橋正樹、河村真保、三井一子、関根整治、石崎直人、金子誠二、甲斐明美、矢野一好、諸角 聖. 2004. 鶏肉におけるカンピロバクター検査法の検討ならびに汚染状況について. 第25回日本食品微生物学会学術総会講演要旨.

11) 横山敬子. 2005. カンピロバクター食中毒の発生状況. 第26回日本食品微生物学会学術総会講演要旨.

12) 百溪英一、オドンゲリル、舒宇静 2005. 染色試薬carboxyfluorescein diacetate succinimidyl (CFDA) および同 succinimidyl estere (CFDA/SE) を用いたヨーネ菌の簡易生死判定と蛍光ラベル法, 動物衛生研究成果情報 No. 4: 33-34.

13) Fujikawa, H., Akemi K., and Morozumi, S. 2003. A new logistic model for bacterial growth. *J. Food*

Hyg. Soc. Japan, **44**:155-160.
14) Fujikawa, H., Akemi K., and Morozumi, S. 2004 A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures. *Food Microbiology* **21**: 501-509.
15) Fujikawa, H., and Morozumi, S. 2005. Modeling surface growth of *Escherichia coli* on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7920-7926..

(3) 食品衛生管理のための有害微生物制御技術の高度化

1) K. Uemura, & S. Isobe, 2002, Developing a new apparatus for inactivating Escherichia coli in saline water with high electric field AC., *Journal of Food Engineering,* 53, 203-207
2) K. Uemura and S. Isobe, 2003, Developing a new apparatus for inactivating Bacillus subtilis spore in orange juice with high electric field AC under pressurized conditions, *Journal of Food Engineering*, 56, 325-329
3) S. Koseki, Y. Mizuno, K. Yamamoto, 2005a, Inactivation and recovery of Escherichia coli ATCC25922 treated with high hvdrostatic pressure, Proceedings of the UJNR 34th Food and Agriculture Panel Meeting, 328-331.
4) S. Koseki, S. Isobe, 2005b, Growth of Listeria monocytogenes on iceberg lettuce and solid media, *International Journal of Food Microbiology,* 101, 217-22
5) S. Koseki, S. Isobe, 2005c, Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table, *International Journal of Food Microbiology*, 104, p. 239-248
6) N. Kondo, M. Murata, K. Isshiki, 2006, Efficiency of Sodium Hypochlorite, Fumaric Acid, and Mild Heat in Killing Native Microflora and *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium DT104, and *Staphylococcus aureus* Attached to Fresh-Cut Lettuce., *Journal of Food Protection,* **69**, No2 (2006) in press.
7) 崎山高明，本田洋一郎，小笠原文恵，福岡美香，萩原知明，渡辺尚彦、2005、固体表面における大腸菌生存率の経時変化、日本食品工学会第 6 回（2005年度）年次大会講演要旨集（124）
8) Jagannath, A., Tsuchido, T. and Membre, J.-M., 2005, Comparison of the thermal inactivation of *Bacillus subtilis* spores in foods by using the modified Weibull and Bigelow equations., *Food Microbiol.* **22**, 233-239
9) S. Todoriki, Md. Latiful Bari, S. Kawamoto, 2005, Elimination of *Listeria* in ground pork by gamma-ray, and analytical method to detect radiation history., 34nd UJNR Food and Agriculture Panel Meeting (Susono), Proceedings: 318-322.
10) 長谷川三喜、2006、搾乳作業及びミルカーにおける乳房炎防止方法の試み、第141回日本獣医学会学術集会合同シンポジウム
11) Md. Latiful Bari, M. Mochida, V. K, Juneja, F. Hayakawa, S. Todoriki, S. Kawamoto, 2006, Iradiation inactivation of Listeria monocytogenes in low fat ground pork at frozen and refrigerated temperature., 第11回放射線プロセスシンポジウム 講演要旨・ポスター発表要旨集, p113, 東京（日本科学未来館）
12) 本田洋一郎, 崎山高明, 福岡美香, 渡辺尚彦、2005、固体表面上での微生物の生育・死滅挙動に対する有機物量の影響、日本農芸化学会2005年度大会講演要旨集（291）
13) T. Miyamoto, Y. Shimizu, H. Kobayashi, K. Honjoh, M. Iio, 2003, Studies of collagen binding with immobilized *Salmonella enteritidis* and inhibition with synthetic and naturally occurring food additives by a surface plasmon resonance biosensor., *Sensors and Materials*, 15(8), 453-466.
14) T. Miyamoto, H. Kobayashi, K. Honjoh, M. Iio, 2004, Studies of collagen binding with immobilized *Salmonella* Enteritidis and inhibition with synthetic and naturally occurring food additives by SPR biosensor., Proceedings of the United States-Japan Cooperative Program in Natural Resources, Food and Agriculture Panel, 33rd Annual meeting, p. 354-358
15) 山本和貴、松原真樹、川崎晋、川本伸一、2004a、大腸菌高圧殺菌の予測微生物学的評価、日本食品工学会第5回（2004年度）年次大会講演要旨集, 89-89

16) K. Yamamoto, M. Matsubara, S. Kawasaki, M. L. Bari, and S. Kawamoto, 2004b, Pressure inactivation kinetics of *Escherichia coli,* Proceedings of the UJNR 33rd Food and Agriculture Panel Meeting, 402-405
17) K. Yamamoto, M. Matsubara, S. Kawasaki, M. L. Bari, and S. Kawamoto, 2005, Modeling the pressure inactivation dynamics of *Escherichia coli, Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 38, 1253-1257.
18) 山根亜希子、Jagannath, A, Legeurinel, I.,坂元仁, 土戸哲明、2005、大腸菌OW6株の熱死滅予測モデリングにおける発育温度と回復温度の影響の解析、日本食品工学会大会要旨集、123
19) 渡邊優子、近藤望美、村田容常、本間清一、2003、カットキャベツに付着した微生物に対する次亜塩素酸ナトリウム及び強酸性水の殺菌効果、日本食品科学工学会第50回大会講演要旨集56
20) 渡邊優子、近藤望美、村田容常、本間清一、2004、キャベツの生育中における食中毒菌の挙動と殺菌、日本農芸化学会2004年度大会講演要旨集、206

(4) 天然毒素等の汚染実態調査及び検出技術の高度化
1) 須崎浩一・兼松聡子・田端節子・伊藤　伝　2004. リンゴ園およびジュース工場におけるリンゴ傷害果からの *Penicillium* 属菌の分離および分離菌株の病原性とパツリン生産能. 日本植物病理学会報. 70:234
2) Watanabe, M. and Shimizu, H. 2005. Detection of patulin in apple juices marketed in the Tohoku district, Japan. *Journal of Food Protection*, 68(3), 610-612.
3) 渡辺満・清水恒2005. 2004年に東北地域で収集したリンゴジュースの安全性確認. 東北農業研究. 58. 249-250.
4) 齊藤初雄・佐藤　剛・田中健治 2003. コムギ赤かび病被害粒におけるマイコトキシン産生量の品種間差異. 日植病報. 69:40-41.
5) 齊藤初雄・田中健治 2004. コムギ赤かび病被害粒におけるマイコトキシン産生量の品種間差異（2）. 日植病報. 70:227.
6) 田中健治・佐藤　剛・齊藤初雄 2003b. 農薬を散布した場合のトリコテセン系マイコトキシンの産生性. 日植病報. 69:282-283.
7) Kenji Tanaka, Hidetaka Kobayashi, Tadahiro Nagata, and Masaru Manabe 2004b. Natural occurrence of trichothecenes on lodged and water-damaged domestic rice in Japan. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 45(2):63-66.
8) Yan, P. S., et al. 2004. Cyclo(L-leucyl-L-prolyl) produced by *Achromobacter xylosoxidans* inhibits aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol* 70:7466-73.
9) 矢部希見子2006. 微生物を利用したアフラトキシンの制御技術. 食糧. 44:39-57.
10) Nagashima, H. et al. 2006. Cytotoxic effects of nivalenol on HL60 cells. *Mycotoxins* 56:65-70.

(5) 栽培技術等による赤かび病かび毒のリスク低減技術の開発
1) 青木孝之, 2004. ムギ類赤かび病菌の分類. 植物防疫 58(5):193-198.
2) 安藤直子・大里修一・柴田武彦・濱本宏・山口勇・木村真　2004. Metabolism of zearalenone by genetically modified organisms expressing the detoxification gene from Clonostachys rosea. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 3239-3245.
3) 東海武史・藤村真・井上弘一・青木孝之・太田邦史・柴田武彦・山口勇・木村真 2005. Concordant evolution of trichothecene 3-O-acetyltransferase and an rDNA species phylogeny of trichothecene-producing and non-producing fusaria and other ascomycetous fungi. *Microbiology*. 151: 509-519.
4) 木村真・東海武史・門倉香・井川智子・福田徹子・大里修一・西山亜里砂・安藤直子・山口勇 2004. Challenge of new Bio-technology for reduction of mycotoxin contamination. In “Collaborative Research for Fusarium Head Blight Resistance in Wheat and Barley”(Ban, T. Ed.), ISSN 1341-710X, pp. 58-63. JIRCAS, Tsukuba, Japan.
5) 杉浦義紹・田中敏嗣・中島 隆 2005赤カビ毒素のリアルタイム PCR 定量ー小麦への応用 第57回マイコトキシン研究会学術講演会
6) Suga H, Karugia GW, Ward T, Gale LR, Tomimura K, Nakajima T, Kageyama K, Hyakumachi M 2005. Development of a PCR-RFLP-based identification system for *Fusarium asiaticum* and genetic characterization of western Japanese isolates. Fungal Genetics Newsletter 52-supplement:p72 (Abst.)

7) Gale LR, Bryant JD, Calvo S, Giese H, Katan T, O'Donnell K, Suga H, Taga M, Usgaard TR, Ward TJ and Kistler HC 2005. Chromosome complement of the fungal plant pathogen *Fusarium graminearum* based on genetic and physical mapping and cytological observations. *Genetics* 171:905-1001.
8) Suga H, Gale LR and Kistler HC 2004. Development of VNTR markers for two *Fusarium graminearum* clade species. *Molecular Ecology Notes* 4:468-470.
9) 福森武・松島秀昭・伊藤隆文・池田憲政・徳井圭裕・河野元信 2004. 赤かび病汚染粒の物理的除去技術の開発－色彩選別機及びペリテック精麦による基礎試験－. 農業機械学会関西支部報（第96号）. 93-94.
10) 福森武・松島秀昭・伊藤隆文・徳井圭裕・河野元信・小泉信三・宮坂篤 2005. 赤かび病汚染粒の物理的除去技術の開発－フルカラーベルトソーター及び精麦製粉によるDON濃度の低減効果－. 農業機械学会関西支部報（第98号）. 104-105.
11) Takafumi Ito 2006. IMPROVEMENT ON WHEAT FLOUR QUALITY Production of Quality Wheat Flour by Colour Sorting and Debranning. Australasian Milling Conference 9th Biennial Conference of the Flour Millers' Council of Australia and the Stock Feed Manufacturers' Council of Australia. 133-138.
12) 小澤徹・清水基滋・安岡眞二 2004. 北海道における赤かび病の発生状況と薬剤によるデオキシニバレノール汚染低減効果. 日植病報. 70:22
13) 小澤徹 2006. 登熟期間における秋まき小麦の外観健全粒中のDON蓄積量の変化. 日植病報. 72:83
14) 藤 晋一・佐藤敏郎・田邊謙二・鈴木倫子・大段隆史・須賀晴久・中村保典・古屋廣光・内藤秀樹 2006. イネから分離された *Fusarium graminearum*-complex のマルチプレックスマイクロサテライト解析. 日植病報. 72: 60（講要）
15) 田邊謙二・藤 晋一・中川 聡・須賀晴久・古屋廣光・内藤秀樹 2005. 北日本のイネから分離された赤かび病菌の PCR による同定とイネへの病原性・毒素産生能. 日植病報. 71: 225（講要）
16) 宮坂篤・小泉信三 2004. コムギにおける赤かび病とマイコトキン汚染を抑制する有効薬剤の選択. 日植病報. 71:43.
17) 宮坂篤・小泉信三 2005. 東日本で分布するムギ類赤かび病菌のマイコトキシン産生性. 日植病報. 71:227.
18) 加藤順久・平野哲司・上田晃久 2005. コムギ赤かび病のラジコンヘリ及びブームスプレーヤを用いた省力防除. 関西病虫研報. 47:173.
19) 中島隆 2005 Making Evidence-based GAP for the reduction of mycotoxin contamination in cereals. Roc. International workshop on Technologies for GAP (Good Agricultural Practice) in the Asian and Pacific Region. p144-158.
20) 中島隆 2005 Chemical and cultural control for FHB and mycotoxin contamination in Japan. JIRCAS Working Report . 37:50-53.
21) 中島隆 2005 ムギ類赤かび病とマイコトキシン汚染防止のための研究戦略. Mycotoxins 55:43-47.
22) 中島隆 2004 Chemical Control for Fusarium Head Blight in Winter Wheat and Mycotoxin Contamination in Japan. Proc. 2nd International Symposium on Fusarium Head Blight. p363
23) 中島隆・冨村健太・吉田めぐみ 2006 コムギ赤かび病防除薬剤の耐雨性の評価. 九州病害虫研究会報52:印刷中
24) 田中 慶 2006. Java による作物生育・病害虫発生予測モデル開発のためのフレームワーク. 農業情報研究. 15(2):183-194.
25) 齊藤初雄・田中健治2004. コムギ赤かび病被害粒におけるマイコトキシン産生量の品種間差異（2）. 日植病報70:27.
26) 齊藤初雄・田中健治 2006. コムギ品種あやひかりのマイコトキシン蓄積耐性の系譜分析. 日植病報72:45
27) 石井英夫・大島美知代・西村久美子・岩間俊太・稲田 稔・清水基滋・吉松英明・中島 隆・青木孝之. 2004. コムギより分離されたFusarium属菌の各種薬剤に対する in vitro 感受性とβ－チューブリン遺伝子のシークエンス解析. 日植病報. 70: 34-35（講要）.
28) Ishii, H., Chung, W.-H., Kaneko, I. and Nishimura, I. 2005. Application of PCR-Luminex system for molecular identification of Fusarium species causing head blight on wheat. Abstr. 2nd Asian Conf. Plant Pathol. 15-16.
28) 堀田光生・中山尊登・島貫忠幸2005a. Competitive

PCR を用いたコムギ赤かび病菌の定量法の検討. 日植病報 71:81.
29) 堀田光生・中山尊登・島貫忠幸2005b. コムギ赤かび病菌の植物内での動態とマイコトキシン蓄積量との関係. 日植病報 71:226.
30) 吉田めぐみ・中島隆・荒井治喜・冨村健太 2004 Mycotoxin productivity of *Fusarium graminearum* in western part of Japan and the virulence on wheat and rice. Proc. International Symposium on Identification and Use of Microbial Resources for Sustainable Agriculture. p84-85.
31) 吉田めぐみ・中島隆・荒井治喜・冨村健太 2004 .Mycotoxin productivity and virulence of Fusarium graminearum in western part of Japan. JIRCAS Working Report. 37:54-57.
32) 吉田めぐみ・中島隆・荒井治喜・冨村健太 2005 Accumulation manner of deoxynivalenol and nivalenol in wheat infected with *Fusarium graminearum* at different developmental stages. Proc. of the 2005 National Fusarium Head Blight Forum. p153.

3 世界的に信頼される分析データ提供システム等の基盤構築

(1) 国際基準に則った食品の安全性保証システムの構築

1) Yoshiro Honma, Shigeru Naito, Amanda Earnshaw, Hitoshi Nagashima, Tetsuhisa Goto, 2004, Progress in the accuracy of mycotoxin anaysis in the last quarter centry, *Mycotoxins*, 54, 33-38
2) Tetsuhisa Goto, Krishan D. Sharma, Hitoshi Nagashina, 2004, Development of enzyme sorbent immunoassay for rubratoxin B, Ed by Takumi Yoshizawa, New Horizon of Mycotoxicology for Assuring Food Safety, Japanese Association of Mycotoxicology, 289-293
3) Kawasaki, S., Fratamico, P. M., and Kawamoto, S. 2005. Species-specific identification of Campylobacters using PCR-RFLP and PCR targeting the gyrase B gene. 34th UJNR Food & Agriculture Panel Meeting, Susono. 291-295.
4) Tsukazaki M. et al. 2004. Effects of tributyltin on barrier functions in human intestinal Caco-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315: 991-997.
5) Zhao Z. et al. 2006. Oral exposure to cadmium chloride triggers and acute inflammatory response in the intestines of mice, initiated by over-expression of tissue macrophage inflammatory protein-2mRNA. *Toxic. Lett.* 164: 144-154.
6) Iikura, H. et al., Cadmium effect on an elemental profile in the edible part of soybean plants revealed by INAA. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 264 (2), 307-311 (2005)
7) Ohya, T. et al., A study of ^{109}Cd uptake and translocation manner in a soybean plant under different pH conditions. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 264 (2), 303-306 (2005)
8) 山下由美子2004. 魚介類に含まれる水銀の蓄積機構, 養殖, **508**, 88-90.
9) Y. Yamashita *et. al.* 2005. Total mercury and methyl mercury levels of commercially important fish and invertebrates in Japan. *Fisheries Science,* 71(5), 1029-1035.
10) 中村澄子・大坪研一・伴　義之・西川恒夫・徳永國男 2006.8. 育種学研究. 8:印刷中.
11) Kunihisa M, et al. 2003. Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. *Euphytica*. 134(2). 209-215
11) Kunihisa M, et al. 2005a. CAPS markers improved by cluster-specific amplification for identification of octoploid strawberry (Fragaria × ananassa Duch.) cultivars, and their disomic inheritance. *Theoretical and Applied Genetics*. 110, 1410 - 1418
12) 中野明正・上原洋一・渡邊　功　2002. 有機農産物認証を受けた果菜類のδ^{15}N 値. 日本土壌肥料学雑誌. 73:307-309
13) 中野明正・上原洋一　2006. イチゴのδ^{15}N 値に及ぼす肥料および土壌窒素の影響. 野菜茶業研究所研究報告. 5. 7-13
14) Hatta, T., Namoto, S. and Kainuma, K. 2003 A surface analytical approach to the structure of starch granules. *J. Appl. Glycosci.* **50**: 159-162.

Ⅸ　特許取得・申請

1　トレーサビリティ・品質表示の裏付けとなる研究開発

(2) 農産物の品種判別技術の開発

1)「豆類の品種判別」(特許公開公報. 特開2004-16008) 紙谷元一ら 2004a.

2)「加工食品の原料品種判定方法」(特許, 特願2005-187107, 2005年6月27日出願)
田原　誠・大江夏子・山下裕樹・丸谷　優・國米修平. 2005.

(3) 畜産物品種・個体判別技術の開発

1)「ウシの品種の鑑別方法」(特開2005-27655) 辻荘一、万年英之、居在家義昭、栗田　崇、高野昇一、長石広志

2)「名古屋コーチン識別用DNAマーカー､検出キット及び名古屋コーチンの識別方法」(特願2006-63959) 高橋秀彰、中村明弘、野田賢治、木野勝敏、峰澤満

(4) 食品の生産・流通履歴の迅速検証技術の開発

1)「残留農薬検出方法」(特願2006-092087) 河野澄夫、ｼﾘﾝﾅﾊﾟｰ ｻﾗﾝｳｫﾝｸﾞ

2　食品の安全性に関するリスク分析確立のための研究開発

(2) 食品衛生管理における有害微生物の増殖予測・検出技術の開発

1) 一色賢司、川本伸一、小川順三. 飲食品等の品質判定手法およびそのインジケーター. 特願2003-322588 (平成15年9月16日.)

(3) 食品衛生管理のための有害微生物制御技術の高度化

1)「乳頭パック、乳頭保護方法及び乳頭パックの塗布方法」(特願2004-233496) 長谷川三喜、本田善文、市来秀之、(株)紀文フードケミファ

(4) 天然毒素等の汚染実態調査及び検出技術の高度化

1)「アフラトキシン等有害物質の分解用組成物」(特願2003-391742) 矢部希見子、中川博之

(5) 栽培技術等による赤かび病かび毒のリスク低減技術の開発

1)「小麦用の色彩選別機」(特開2005-028302) 池田憲政

3　世界的に信頼される分析データ提供システム等の基盤構築

(1) 国際基準に則った食品の安全性保証システムの構築

1) 大坪研一・中村澄子・星　豊一・松井崇晃・石崎和彦 2004. 稲の同質遺伝子系統識別方法及び当該識別技術を利用した米の産地識別方法. 日本特許. 特開2004-141079、公開日: 2004年5月20日

Ⅹ　研究担当者

1　トレーサビリティ・品質表示の裏付けとなる研究開発

(1) ユビキタスによる食農情報提供技術の開発

独立行政法人食品総合研究所
　杉山純一*、石川豊、岡留博司
国立大学法人東京大学大学院
　相良泰行*、蔦瑞樹
国立大学法人筑波大学
　北村豊*
新潟農業総合研究所
　牛腸奈緒子・白井敏樹
株式会社ユーワークス
　宇田渉

(2) 農産物の品種判別技術の開発

独立行政法人食品総合研究所
　大坪研一*、中村澄子、鈴木啓太郎
独立行政法人農業生物資源研究所
　奥泉久人*、加賀秋人*、友岡憲彦、ダンカン・ヴォーン、伊勢村武久
群馬県農業技術センター こんにゃく特産研究センター
　飯塚弘明*
独立行政法人農業技術研究機構　近畿中国四国農業研究センター
　矢野　博*、藤田由美子*、池田達哉、柳澤貴司*
香川県農業試験場

十鳥秀樹*、村上恭子、村上てるみ、藤田 充、三木哲弘、多田伸司
愛媛県農業試験場
清水国広、栗坂信之*、岡本充智
北海道立中央農業試験場
紙谷元一*・竹内 徹・田澤暁子・冨田謙一
独立行政法人農業技術研究機構 野菜茶業研究所
塚崎 光*、小島昭夫、山下謙一郎、若生忠幸、福岡浩之*、大山暁男、布目司、宮武宏 治、中野明正、上原洋一*、篠原 信
大阪府立食とみどりの総合技術センター
谷本秀夫*、古川 真、橘田浩二、西岡輝美
独立行政法人農業技術研究機構 果樹研究所
山本俊哉*、西谷千佳子、清水徳朗*
福島県果樹試験場
大橋義孝*、木幡栄子、小野勇治、佐藤 守
独立行政法人種苗管理センター
木村鉄也*
独立行政法人森林総合研究所
馬場崎勝彦*
岡山大学
田原 誠*、山下裕樹、大山由美

(3) 畜産物品種・個体判別技術の開発
独立行政法人農業生物資源研究所
土肥宏志*、春海隆*、上西博英*、栗田 崇
独立行政法人農業技術研究機構 畜産草地研究所
三橋忠由*、高橋秀彰*
独立行政法人農林水産消費技術センター
森田正晶*、栗原秀夫
国立大学法人神戸大学
万年英之*
国立大学法人広島大学
都築政起*
社団法人農林水産先端技術産業振興センター農林水産先端技術研究所
奥村直彦*、松本敏美*
社団法人畜産技術協会付属動物遺伝研究所
杉本喜憲*、高須賀晶子、渡邊敏夫、平野 貴、井原尚也、横内 耕
岩手県農業研究センター畜産研究所
安田潤平*、佐藤洋一、鈴木暁之、小松繁樹、吉川恵郷

(4) 食品の生産・流通履歴の迅速検証技術の開発
独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所
岡﨑惠美子*、山下由美子、大村裕治、Musleh Uddin、高嶋康晴、齋藤洋昭*、桑原隆治
独立行政法人食品総合研究所
等々力節子*、シリンナパー サランウォング、河野澄夫*

2 食品の安全性に関するリスク分析確立のための研究開発

(1) 最近判明したリスクの解明と制御およびコミュニケーション
独立行政法人食品総合研究所
吉田充*、小野裕嗣、箭田浩士、山田友紀子、小林秀誉、林徹*
独立行政法人農林水産消費技術センター
忠田吉弘
独立行政法人農業技術研究機構 野菜茶業研究所
水上裕造*、木幡勝則、山口優一、林宣之、澤井祐典
国立行政法人静岡大学
河岸 洋和*

(2) 食品衛生管理における有害微生物の増殖予測・検出技術の開発
独立行政法人 食品総合研究所
川本伸一*、稲津康弘、Md. Latiful Bari、川崎 晋
国立大学法人東京大学大学院
熊谷 進*、林谷秀樹、工藤由起子
東京都健康安全センター
甲斐明美*、尾畑浩魅、下島優香子、諸角 聖、矢野一好*、高橋正樹、横山敬子、藤川 浩*
国立大学法人東京海洋大学
藤井建夫*、木村 凡
独立行政法人 農業技術研究機構 動物衛生研究所
百渓英一*、オンドリル

(3) 食品衛生管理のための有害微生物制御技術の高度化
独立行政法人食品総合研究所
五十部誠一郎*、稲津康弘*、金子 哲*、Md. Latiful Bari*、山本和貴*、川本伸一、小関成樹、等々力節子

独立行政法人農業技術研究機構　畜産草地研究所
長谷川三喜*、石田三佳、市来秀之、本田善文
国立大学法人九州大学大学院農学研究院
宮本敬久*
国立大学法人お茶の水女子大学
村田容常*、近藤望美、福山さとみ、渡辺優子
国立大学法人東京海洋大学
崎山高明*、渡辺尚彦
学校法人関西大学
土戸哲明*

(4) 天然毒素等の汚染実態調査及び検出技術の高度化
独立行政法人農業農業技術研究機構　動物衛生研究所
宮崎茂*、山中典子、三上修*
独立行政法人農業技術研究機構 果樹研究所
須崎浩一*、伊藤伝、兼松聡子
独立行政法人農業技術研究機構 東北農業研究センター
渡辺満*、清水恒
独立行政法人食品総合研究所
久代真代、田中健二、中川弘之、矢部希見子、長嶋等
東京都健康安全研究センター
田端節子
財団法人日本穀物検定協会中央研究所
堤　徹、金丸直樹、法月廣子

(5) 栽培技術等による赤かび病かび毒のリスク低減技術の開発
独立行政法人農業生物資源研究所
青木孝之*
独立行政法人理化学研究所
木村真*
兵庫県神戸市環境保健研究所
杉浦義紹*
国立大学法人岐阜大学
須賀晴久*
(株)サタケ
松島秀昭、伊藤隆文、原正純、谷本宏、細藤慎司、高山篤*、立石芳和、河野元信
北海道立農業試験場
小澤徹*、相馬潤、清水基滋
公立大学法人秋田県立大学
藤晋一*、古屋廣光、内藤秀樹
独立行政法人農業技術研究機構　九州沖縄農業研究センター
中島隆*、吉田めぐみ*、荒井治喜
独立行政法人農業技術研究機構　中央農業研究センター
宮坂篤、小泉信三、川上顕*、田中慶*、齊藤初雄*、菅原幸治、平藤雅之
独立行政法人農業技術研究機構　北海道農業研究センター
堀田光生*、島貫忠幸、中山尊登
愛知県農業総合試験場
加藤順久*
独立行政法人農業環境技術研究所
石井英夫*

3　世界的に信頼される分析データ提供システム等の基盤構築

(1) 国際基準に則った食品の安全性保証システムの構築
国立大学法人信州大学農学部
後藤哲久
財団法人食品薬品安全センター
大島赴夫、福原克治、鈴木達也*
独立行政法人食品総合研究所
川崎晋*、川本伸一、進藤久美子*、内藤成弘、山田友紀子、大坪研一*、中村澄子
国立大学法人東京大学大学院
清水　誠*、薩　秀夫、Hyun Ja Shil、Zhao Zhaohui、西友子*、飯倉寛、田野井慶太朗、大矢智幸、二瓶直登、羽鹿牧太
独立行政法人水産総合研究センター
山下由美子*
独立行政法人農業技術研究機構　野菜茶業研究所
國久美由紀*、松元哲、上田浩史、中野明正、上原洋一*、篠原　信
独立行政法人国際農林水産業研究センター
八田珠郎*、山本和貴

(*執筆者)

ＸＩ　取りまとめ責任者あとがき

平成12年に開始された食品総合プロジェクトは、当初は機能性研究のみであったが、平成14年に安全性の研究19課題が加えられた。この時期に、BSE 問題や偽装表示等の一連の食品を巡る不祥事により、安全と信頼を確保するための研究が強く求められるようになった。その結果、平成15年度には予算・課題数とも前年の約５倍規模になって、平成17年度までプロジェクトは続けられた。

平成15年からの３年間は、信頼確保のためのトレーサビリティや表示の検証技術、安全確保のための危害要因の分析や制御の研究、国際的に通用する分析データ提供の３つの柱で研究を進めた。ほぼ同様のプロジェクトの枠組みで平成18年度から「安全で信頼性、機能性が高い食品・農産物供給のための評価・管理技術の開発」プロジェクトが開始されている。

「食の安全・安心」という言葉がよく使われるが、安心か不安かは心理的なものであり安心という語はプロジェクトになじまない面もある。しかし偽装は、多くの市販食品の唯一の情報源である表示の信用を失墜させたのも事実である。表示が社会的な問題となっていた平成14年６月に内閣府が発表した「食品表示に関する消費者の意識調査」結果では、「表示されていることが信用できなくなった」という人が78％に達し、「前からそうしている」４％を加えると、８割以上の人が表示を信用していない。表示の検証技術へのニーズは著しく高くなったといえる。DNA 分析による品種の科学的検証については、平成10年に精米１粒の品種判別が可能となり、平成11年には黒豚の肉の判別法も特許出願されていた。本プロジェクトでは、より多くの農畜産物の品種判別技術を開発することになり、さらに DNA 抽出が困難な加工品も研究対象に拡げた。また知財保護のニーズも最近増大しているが、品種判別は育成者権侵害に対する対抗手段としても活用できる。

一方で、上記の消費者の意識調査が行われた平成14年は、大腸菌 O157による死亡事件などがあり、食中毒による死者が18名に達した。これは昭和59年の21名以来の大きな被害である。健康被害という観点から、食中毒菌は食生活の最大の脅威と捉える専門家は多いが、報道を含む一般的な認識はかならずしもそうではない。本プロジェクトの中では、安全確保を３つの柱の最大のものとして、その中でも有害微生物の検知や制御の研究に、最も勢力を注いだ。同時に過去数年で新たな規制が加わったかび毒の研究についても多くの研究者が参加した。特に平成14年に暫定基準が定められたデオキシニバレノールは、植物病原性を持つ赤かびが産生する毒物であるため、栽培管理を含む汚染源対策に力を入れた。さらに赤かび毒素分析の精度管理のためのプロフィシエンシィテスティングの課題も、本プロジェクトに盛り込んだ。

３番目の柱は、分析の品質保証と国際標準化がキーワードといえる。母集団があやふやな実態調査や、妥当性確認が行われていない分析法、精度管理が行われていない試験室のデータは、国際的には通用しない。そこで、品種判別の一部も AOAC のガイドラインのレベルの、妥当性確認を行うという考えで進めてきたが、これについてはさらに作業が必要である。DNA 分析の妥当性確認という点で、日本は遺伝子組換え農産物の定量分析では世界の先陣をきった。こうした研究開発では論文など学術面の評価だけでなく、知財保護あるいは日本の基準・方法を海外に普及するという面からの貢献まで含めた評価を行うことが望ましい。

（推進リーダー：永田　忠博）

第１編　トレーサビリティ・品質表示の裏付けとなる研究開発

第１章　ユビキタスによる食農情報提供技術の開発

１　農業情報のユビキタス化に関する研究

ア　研究目的

農産物の産地表示が義務づけられ、消費者の安全性に対する関心が高まるなかで、食品の表示偽造問題がクローズアップされ、農産物の信頼性確保が急務とされている。これらの解決には、①的確な品質計測技術と②それを消費者まで確実に伝達する情報公開技術が必要である。本課題では、緊急性と波及効果の点から、特に多品目の農産物を対象とした②の情報伝達技術の実用化を、①を念頭に入れながら開発するとともに、その情報コンテンツの信頼性確保をするための基盤技術を開発することを目的とする。

イ　研究方法

(ｱ) 誰もが自由に利用できるオープン＆フリーの農産物データベース（青果ネットカタログーSEICA）を開発するとともに、そこに蓄積されているデータを再利用して、流通業者が内容のチェックをした上で、独自デザインのホームページを自社サイトから公開できる技術を開発する。

(ｲ) 上記のシステムを実際の大手流通業者の協力のもとに実証試験を行い、Web アンケートにより効果の把握を図る。

(ｳ) 偽装が深刻な問題である米をモデルとして、産地から玄米流通した米に対する偽証防止システムを開発する。

(ｴ) 農産物（青果物）の生産情報公表 JAS の標準入力フォームの設計を行い、実際にその情報公開が可能なシステムを開発する。

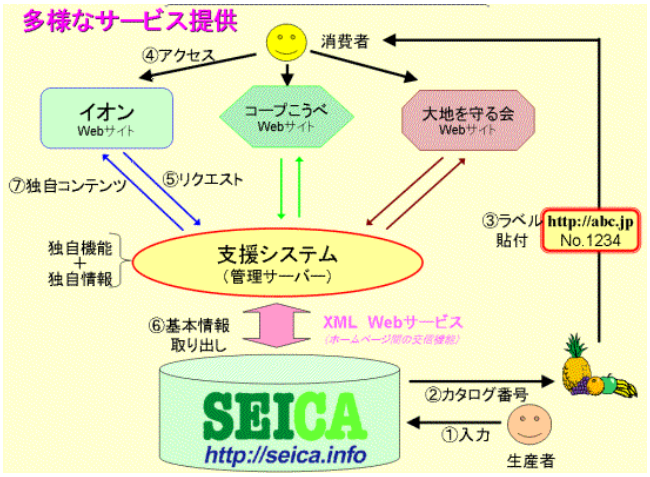
ウ　研究結果

(ｱ) SEICA を開発・構築するとともに、そこから該当するカタログ情報を取り込み、内容の確認、デザインの変更等を行った上で指定のホームページに表示する技術を開発した。イオン、コープこうべ、大地を守る会の 3 社にて、各社のホームページアドレスと SEICA のカタログ番号を記載したラベルを貼り付け、販売実験を行った。（図1101-1、図1101-2）

(ｲ) Web アンケートの結果では、①このような情報提供システムは90％の人が必要だと考えている。②一般的に、農産物の表示に対する関心は高く、情報公開の不十分さによる不満が多い。③最も気になる情報は「農薬」に関連する情報である。④情報提供手段は「インターネット」が望ましい。⑤消費者へのコスト負担は、商品価格の3％未満で可とするのが43％程度であった。

(ｳ) 米の偽証防止の仕組みとして、消費者がホームページにアクセスすることにより、産地側データベースに蓄積された情報と照合を図り、①精米情報入力の有無、②包装に表示された精米日との一致、③包装に表示された精米業者名との一致、④ホームページ閲覧回数、といった 4 つのチェックにより、商品の真偽が確認できるシステムを開発した。（図1101-3）

(ｴ) 既存の SEICA の入力項目と、生産情報公表 JAS の入力項目の対応を検討し、重なっている項目は、SEICA に記入済みのデータを新しい公表 JAS のフォームに自動転記する方法を実現した。記入される農薬や土壌改良材の数は、作物により異なり、最大必要項目数が不特定であるので、それに対応したフォームの開発を行った。具体的には、10種類以上の記入をする場合は、別ウィンドウを開いて作業できるような入力方式を開発した。（図1101-4）



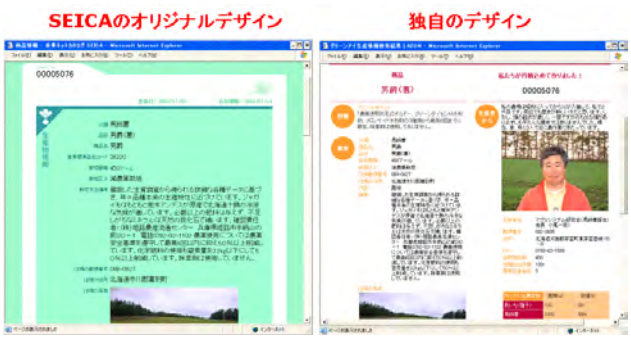


図1101-2　SEICA から独自デザインへの変換

図 1101-1　SEICA をベースとした流通支援システム

図 1101-3　米の偽証防止システム

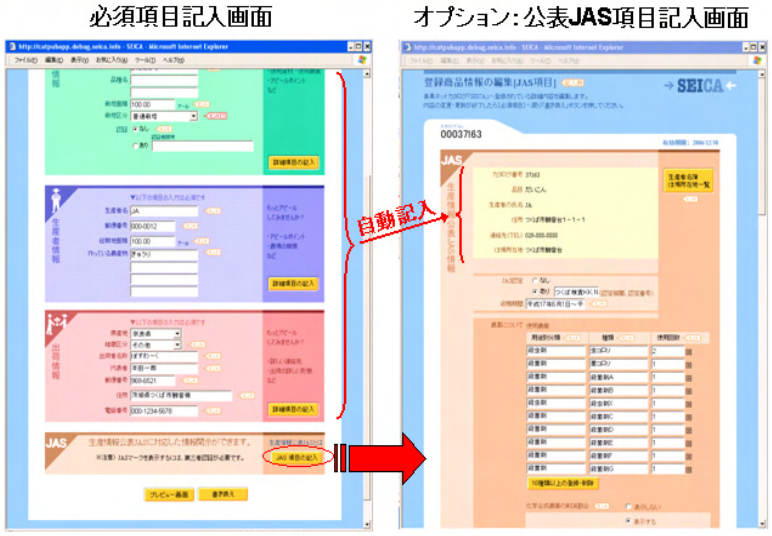


図 1101-4　公表 JAS の入力画面

エ　考　察

(ｱ) SEICA に蓄積された XML データの可搬性が本システムで有効に活用され、比較的容易にそれぞれの Web サイトの独自性を保った情報公開が可能になった。ひとつの実用的な技術として評価できる。（杉山2003,2004a,2004b,2005）

(ｲ) 幅広い産地、多様な品目、そして全国規模の不特定多数の消費者を対象とした実証実験は、スムーズに実施され、システム運用において大きな支障もなく、情報公開が可能であった。

(ｳ) システムは作ったものの、異なった識別子のラベル供給が問題となり、実用にはもう一工夫が必要と感じられた。

(ｴ) 生産情報公表 JAS マークを記載するには第三者機関の認定を受けなければならない。しかし、現実には認定を受けずに JAS のフォームで情報公開したいというニーズもあるため、認定の有無が一目でわかるような開示方法を開発し、利便性の向上を図った。

オ　今後の課題

(ｱ) 本技術を実用的に利用しているところも表れ、特に問題はない。

(ｲ) 識別子の付与に手間とコストをかけない手法を開発する必要がある。

(ｳ) 玄米流通の現場で実証を行い、実用に向けての問題点を明かにする必要がある。

(ｴ) 今後、実際に生産者に使ってもらいながら、不具合点は改良を続けていく。また、消費安全局表示規格課と連絡をとりながら普及に努めるとともに、さらに活用を拡げるために農薬ナビ（http://nouyaku-navi.info/）等の他システムとの連携を進めていく。

カ　要　約

(ｱ) 誰もが自由に利用できるオープン＆フリーの農産物データベース（青果ネットカタログ－SEICA）を構築するとともに、そこに蓄積された情報を独自デザイン、独自サイトから情報公開できる技術を開発した。

(ｲ) 実際の大手スーパー等で実証試験を行い、実用的に使えることを証明した。

(ｳ) 偽装が深刻な問題である米をモデルとして、産地から玄米流通した米に対する偽証防止システムを開発した。

(ｴ) 産物（青果物）の生産情報公表 JAS の標準入力フォームの設計を行い、実際にその情報公開が可能なシステムを開発した。

キ　引用文献

杉山純一 2003.インターネットを利用した農産物流通における情報公開とトレーサビリティ. 冷凍. 78:54-59.

杉山純一 2004a.食品のトレーサビリティと情報技術.日本包装学会誌.13:17-23.

杉山純一 2004b.トレーサビリティと情報公開技術. 日本食生活学会誌.14:263-265.

杉山純一 2005.青果ネットカタログ「SEICA」の展望. システム農学.21:149-155.

担当研究者（杉山純一*）

2　流通・食品産業における IC タグ利用技術の開発

ア　研究目的

近年、ネットワークの普及にともない、情報ユビキタス化が叫ばれ、特にバーコードの次を担う新しいツールとして、IC タグが話題になっている。既に、農産物に IC タグをつけて生産履歴情報を公開するなどの実証試験も各所で行われているが、IC タグのコストだけでなく、リーダーの普及や規格の統一が不透明なため、実用には程遠いのが現状である。そこで本研究では、食品分野における実用的な用途としてスーパー店頭や一般家庭において利用可能なレシピ開示端末をとりあげ、民間各社の IC タグが容易に対応可能な汎用システムを構築して実証試験を行い、その効果とコストパフォーマンスを検証することを目的とする。

イ　研究方法

(ｱ) レシピ・データベースの開発：実務者が簡単にデータ入力ができ、情報開示ができるレシピデータベースを開発する。

(ｲ) IC タグ対応レシピ開示端末の開発：レシピの写真カードをかざすだけで、レシピや必要な素材、店頭にある商品の生産情報を開示するような端末を開発する。

(ｳ) 実証実験と効果判定：実際にスーパーや食堂、モデルハウス等でそれらを利用して、その活用度を測定する。

ウ　研究結果

(ｱ) レシピ・データベースの開発：Web ベースで写真とレシピを登録できるデータベースを開発し、それらの情報を Web サービスで公開・店頭端末に転送できるシステムを構築した。その際レシピ情報だけでなく、農産物や加工食品の生産情報も合わせて開示できるようなものにして、消費者への安心情報も提供できるようにした。

(ｲ) ミューチップ対応型レシピ開示端末の構築：レシピ写真カードや農産物・加工食品の包装部分にミューチップインレット(IC チップ+アンテナ型の IC タグ）を埋め込み、それらをリーダーにかざすだけで必要な情報開示を行える端末を構築した。リーダーは 1 台で済むためコストを抑えた IC タグの活用が可能となった。IC タグの再利用については、レシピカードの紛失防止および消費者からの回収が課題である。

(ｳ) 実証試験と効果判定： 500名弱の男女から、レシピ開示端末の実体験に基づくアンケート調査を実施した。その解析結果から IC タグ利用による食の情報開示システムの実用性と問題点が適確に把握され、今後の開発・活用用途への指針が得られた。

図 1102-1　情報端末の概要

図 1102-2　情報端末の構成

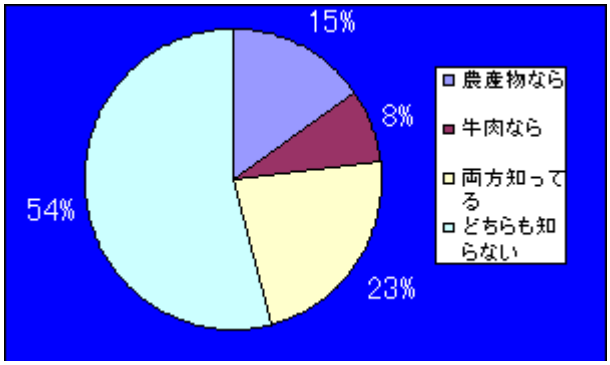


図 1102-3　Web による生産情報閲覧の認知度

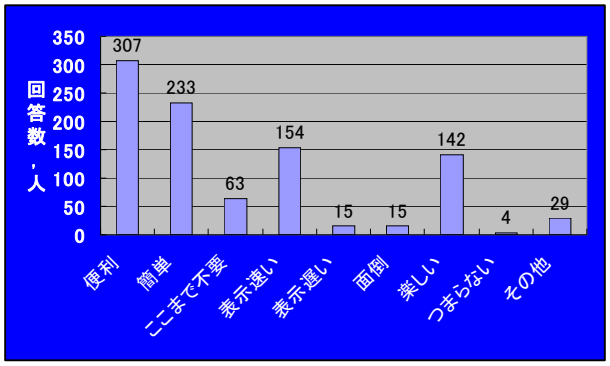


図 1102-4　情報端末の操作性

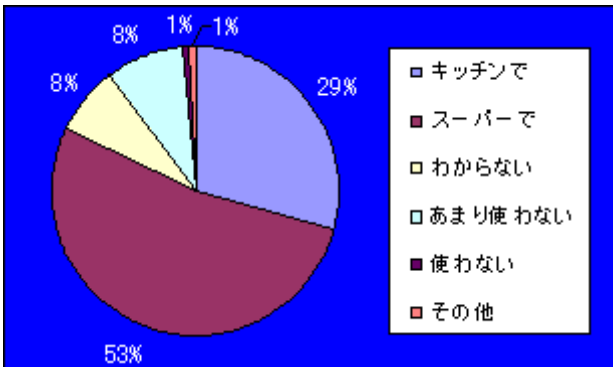


図 1102-5　情報端末の設置希望場所

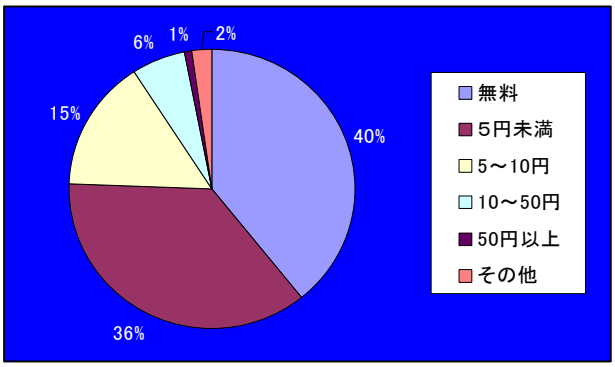


図 1102-6　情報端末利用に関わるコスト負担

エ　考　察

アンケートの解析結果より、IC タグ利用レシピ開示端末の機能として、１）店頭設置型、２）音声応答、３）プリントアウト出力、４）レシピと食の安心情報とのリンク、５）無料もしくは低コスト利用、等が望まれていることが判明した。従って今後はこれらの機能を具備した KIOSK 型（店頭や小規模スペースでのスタンド型）の情報開示端末を構築し、実際に店舗での運用上の問題点の把握や消費者に対する利便性・安心確保の効果あるいは販促効果などの検証が課題である。

オ　今後の課題

電子マネーや交通機関の乗車パスとして、実用的に最も普及しているフェリカタイプの IC タグとそのリーダーを組み込んだシステムの開発も行い、情報書換え型 IC タグの実用性と問題点についても今後明らかにする必要がある。

カ　要　約

(ｱ) インターネット上に配置するレシピ・データベースの開発を行った。

(ｲ) 上記のデータベースから、インターネットを介してレシピの写真カード（IC タグ）をかざすだけで、レシピや必要な素材、店頭にある商品の生産情報を開示するような端末を開発した。

(ｳ) 実際に開発した装置を利用してもらい、その活用度を測定した。

研究担当者（北村豊*）

3　農産物直売所における情報活用技術の開発

ア　研究目的

農産物直売所間の競争や消費者からの鮮度・品質・安心安全への期待が高まる中、近年、直売所において適切な商品管理や生産情報の開示を行うことの重要性が増してきている。本課題では、直売所のような小規模の環境において、生産履歴に付与された ID を効率的に使って販売管理、入出荷管理、生産情報開示の 3 作業を一括して行い、トレーサビリティとマーケティングの両立を可能にする情報システムの開発を目的とする。

イ　研究方法

(ｱ) 商品コードの開発：SEICA カタログ番号をベースに、販売管理・入出荷管理・生産情報開示を一括して行うことが出来る商品コードを開発する。

(ｲ) POS システムの開発：SEICA カタログ番号を利用して販売管理・入出荷管理を行うことのできる POS システム（販売時点管理システム）を開発する。また、販売情報を Web で開示するシステム（佐藤ら 2005）とも連携できる機能を付加する。

ウ　研究結果

(ｱ) 販売管理の標準規格である JAN13をバーコードの規格として採用し、SEICA カタログ番号（8桁数字）と荷姿（２桁数字）を含む商品コードを設計した（図1103-1）。これにより SEICA 番号での細緻な販売管理と農産物の情報開示を一括して行うことのできるシステムの構築が可能となった。バーコードには価格情報が入らないため、レジ打ち時に価格マスタから価格情報を引き出す PLU 方式(価格参照方式)を採用した。

(ｲ) SEICA 番号による商品識別を行うことで、①生産者毎に品種、荷姿のレベルまで売れ筋を把握すること、②SEICA カタログ情報に含まれる青果標準品名コードによって標準的な品目分類での売れ筋を把握することの二点が同時に可能となった（図1103-2、図1103-3）。

図1103-1　SEICA カタログ番号を利用した JAN13のバーコード

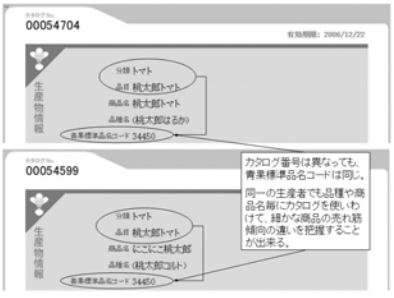


図1103-2　SEICA による個体識別と青果標準品名

エ　考　察

(ｱ) POS においては工場製品や加工品では JAN コードが使われるが、農産物においては、産地、規格が多すぎて13桁の JAN コードを付与することが困難である。そこで、JAN コードの一部であるプライベート JAN コードの中に、SEICA の番号を入れることで、POS 対応をしながら、インターネット経由で産地、生産者等の識別も同時にできるようなシステムになる得ると考えられる。但し、その際の導入条件として、インターネット回線が必須となる。

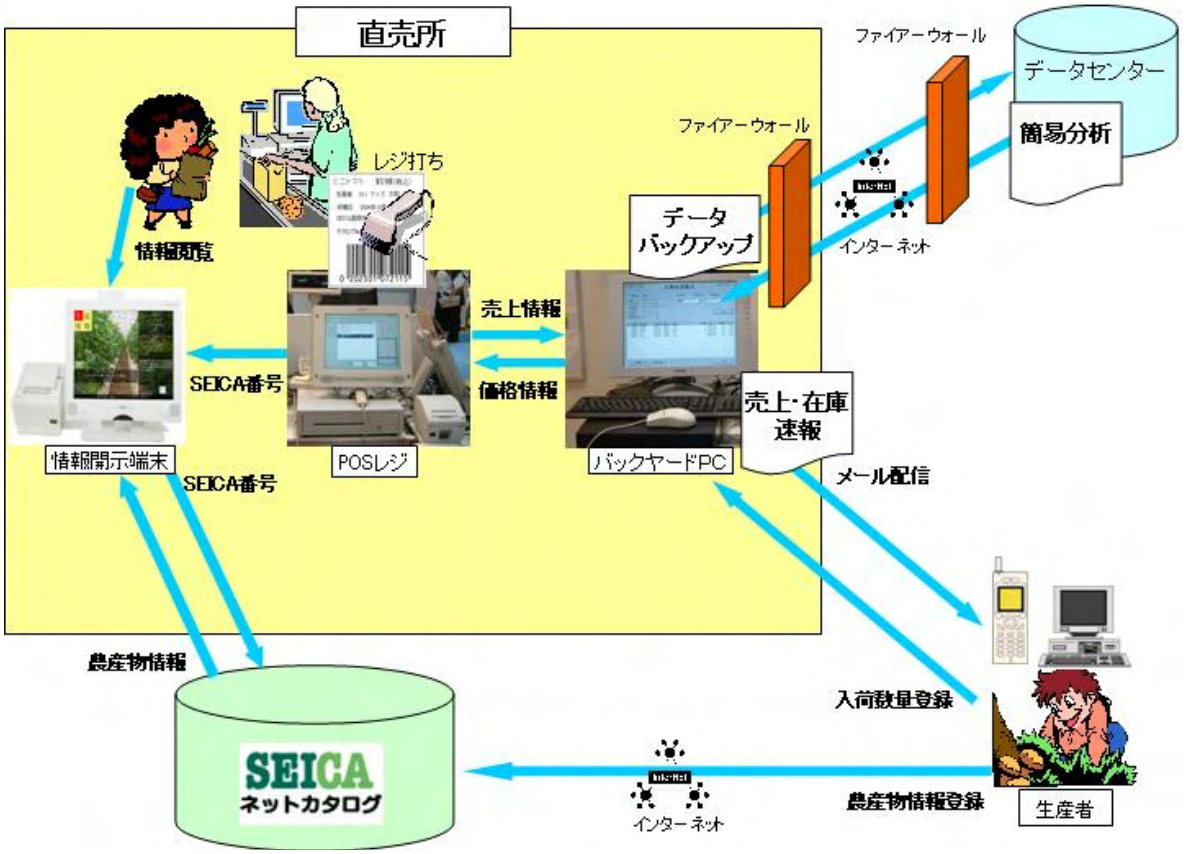


図1103-3　POS システム及び情報開示システム

(ｲ) 従来、店舗で使われているインストア・コード、既存 JAN コードとも互換性をとりながら、青果標準品名コードにより販売管理、入出荷管理、生産情報開示が統一的にできるシステム構築への基盤技術となりうるものである。

オ　今後の課題

(ｱ) 顧客管理システム（会員システム）と SEICA による POS システムを組み合わせ、顧客個別の購買傾向の把握、および、生産者と顧客とのコミュニケーションにより信頼性確保が実現できるシステムを構築する。

(ｲ) 販売情報の分析結果を情報活用に不慣れな直売所管理者や生産者でも簡単に理解し、活用することのできるユーザーインターフェースを開発する。また、フィールドサーバの情報を商品に紐付けて発信する技術を開発し、より質が高く、信頼性の高い安心情報提供システムを構築する。

カ　要　約

(ｱ) 商品コードの開発：SEICA カタログ番号をベースに、販売管理・入出荷管理・生産情報開示を一括して行うことが出来る商品コードを開発した。

(ｲ) SEICA カタログ番号を利用して販売管理・入出荷管理を行うことのできる POS システム（販売時点管理システム）を開発した。

キ　引用文献

佐藤和憲ら　2005. 農産物直売所の POS に対応した販売情報システム. フレッシュフードシステム. 34:28-

担当研究者（相良泰行*、蔦瑞樹）

第 2 章　農産物の品種判別技術の開発

1　米加工製品における品種・産地判別

ア　研究目的

インゲンマメやイチゴなどの登録品種を不正に国外に持ち出す事例があり、農水省種苗課では、植物育成者権保護のため、平成15年に種苗法改正を行った。その後、農産物ではなく、加工品として不正輸入する事例に備えて、平成17年度に加工品も対象に含める改正を行った。輸入品鑑定には短時間で可能な DNA 判別技術が必要とされる。本研究では、こうした行政ニーズに応えるために、米飯等の米加工製品を試料とする DNA 品種・産地判別技術を開発することを目的とする。

イ　研究方法

(ｱ) PCR 用の有用プライマーの開発

a RAPD 法による有用マーカーの探索

市販ランダムプライマーを用いる RAPD 法により、識別用好適マーカーを選抜した。

b プライマーの STS 化とデータベースの拡充

RAPD 法で見出した好適識別マーカーで増幅した DNA を抽出して塩基配列を決定し、それに基づいて STS プライマーを開発した。

(ｲ) 米加工製品からの PCR 用鋳型 DNA 抽出・精製技術の開発

無菌米飯、発芽玄米、レトルト粥、冷凍米飯、乾燥米飯等の各種の市販米加工製品を対象に、PCR 用鋳型 DNA の抽出・精製方法の開発を試みた。

(ｳ) 日本酒等、醸造酒を試料とする原料植物判定技術の開発

a 試料前処理技術の検討

醸造酒では、DNA 濃度が薄く、発酵過程で分解されているので前処理を検討した。

b PCR 用鋳型 DNA の醸造酒からの抽出・精製技術の開発

ウ　研究結果

(ｱ) PCR 用の有用プライマーの開発

RAPD 法により有用マーカーを選抜し、増幅 DNA を抽出して塩基配列を決定し、それに基づいて STS プライマーを開発した。各種の米の判別例を表1201-1に示す。

(ｲ) 米加工製品からの PCR 用鋳型 DNA 抽出・精製技術の開発

各種市販米加工製品を対象に、PCR 用鋳型 DNA の抽出・精製方法として、改良酵素法、CTAB 法、市販キット法の比較を行った結果、改良酵素法で最良の結果が得られた。試験に用いた米加工製品と改良酵素法で調製した DNA による識別例を図1201-1，2に示す。

(ｳ) 日本酒等、醸造酒を試料とする原料植物判定技術の開発

a 試料前処理技術の検討

加熱乾燥法、低温濃縮法、凍結乾燥法などの前処理法を検討した結果、凍結乾燥法で最良の結果が得られた。

b PCR 用鋳型 DNA の醸造酒からの抽出・精製技術の開発

粉末試料から DNA を効率よく、高濃度かつ高純度に抽出・精製する方法を検討した結果、図1201-3に示す抽出・精製方法を開発し、図1201-4に示す判別例が得られた。

表1201-1　開発したSTS化プライマーによる米の識別例

		P5	E30	WKA9	B43	M11	G22	G28	F6	B1	M2CG
1	あきろまん	−	＋	−	＋	＋	−	＋	＋	＋	＋
2	ねばり勝ち94	−	−	−	＋	±	−	＋	＋	＋	−
3	どんとこい	＋	−	−	＋	＋	−	−	−	＋	＋
4	ソフト158	−	−	−	＋	＋	−	＋	−	＋	＋
5	スノーパール	−	＋	−	−	＋	−	−	±	＋	＋
6	こいごころ	±	＋	−	＋	＋	−	−	±	＋	−
7	ミルキークイーン	＋	±	−	＋	＋	＋	＋	±	＋	＋
8	おどろきもち	−	±	−	＋	−	−	＋	＋	＋	＋
9	きらり宮崎	＋	±	＋	＋	＋	＋	＋	＋	±	±
10	柔小町	±	±	−	＋	−	−	＋	＋	＋	＋
11	おまちかね	＋	±	−	＋	＋	−	＋	＋	＋	−
12	つくし早生	＋	−	＋	−	＋	−	＋	−	＋	−
13	ふさおとめ	−	−	＋	−	＋	−	＋	−	±	＋
14	みつひかり　2005	＋	−	＋	＋	＋	−	＋	−	＋	−
15	ほしのゆめ	＋	＋	±	−	−	＋	＋	±	±	＋
16	あきほ	＋	±	＋	＋	−	＋	＋	±	±	＋
17	かりの舞い	＋	−	＋	＋	＋	＋	＋	±	±	−
18	つがるロマン	＋	−	＋	−	＋	−	＋	＋	±	±
19	夢十色	＋	＋	−	＋	−	−	＋	＋	＋	＋
20	ゆめひたち	＋	−	−	−	＋	−	＋	±	±	±
21	おきにいり	−	＋	＋	−	＋	−	＋	±	±	−
22	ゆめむすび	＋	−	＋	−	＋	−	＋	−	＋	−
23	あさひの夢	−	−	＋	−	−	−	＋	±	＋	−
24	森のくまさん	＋	−	＋	＋	＋	−	−	−	＋	＋
25	夢いずみ	＋	−	−	＋	＋	−	＋	±	＋	±

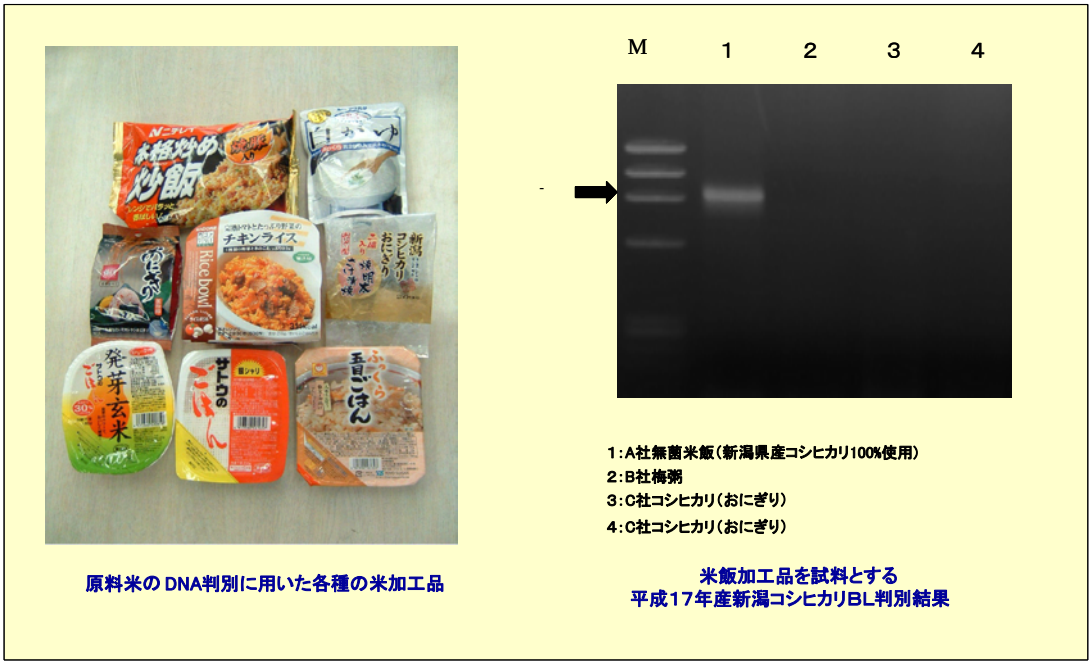
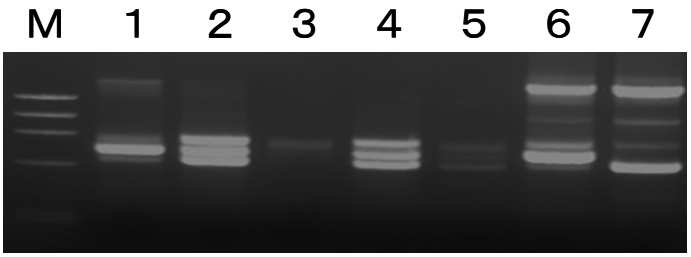
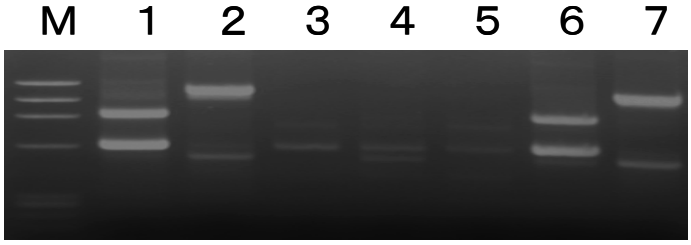


図1201-1　試験に使用した米加工製品および新潟コシヒカリの識別例



コシヒカリポジキット

北海道61



M2CG+A65

1:発芽玄米(サトウのごはん) 2:サトウのごはん無菌米飯 3:マルちゃん五目ごはん 4:アオハタ白かゆ
5:チキンライス(カゴメデリ) 6:尾西おにぎり(α米) 7:ニチレイ 本格炒め(炒飯)冷凍米飯

図1201-2 各種の米加工製品から改良酵素法で調製した DNA による PCR の結果

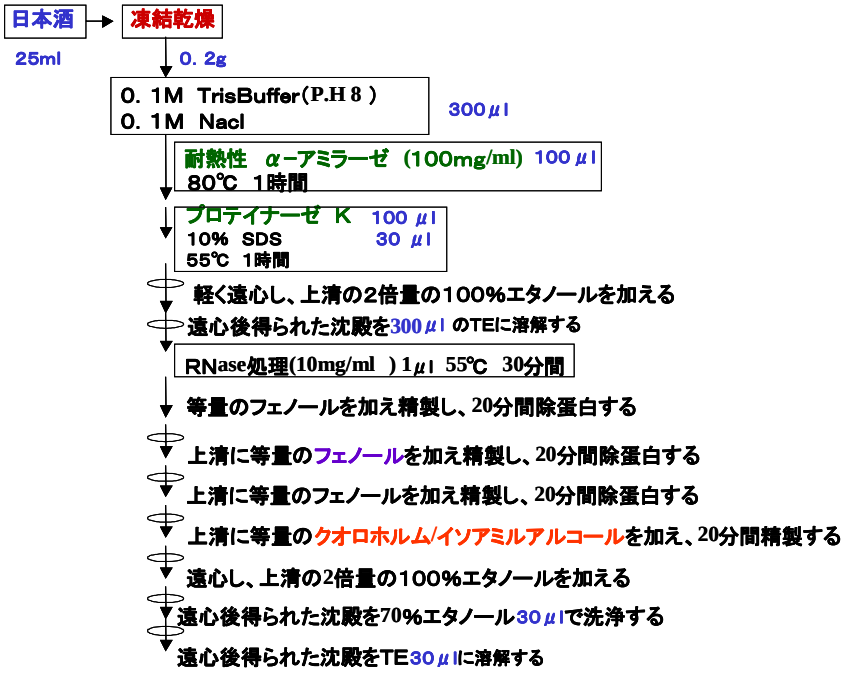


図1201-3 醸造酒からの PCR 用鋳型 DNA の調製方法

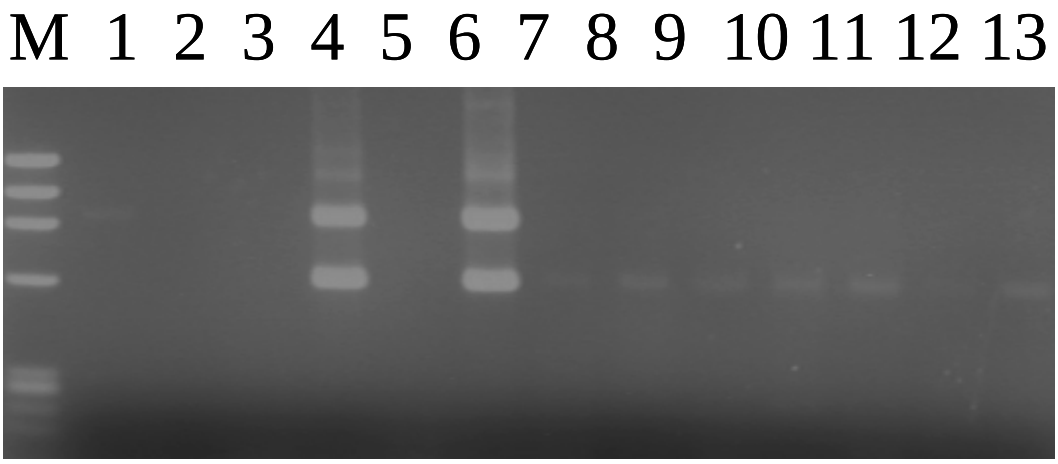


図 1201-4　酒米及び醸造酒から調製した DNA を鋳型とする PCR の結果
（M:DNA 分子量マーカー、1：麹菌、2：酵母、3-6：酒米、7-13：酒）

エ　考　察

無菌米飯、レトルト粥等の各種の米加工品から PCR 用鋳型 DNA を抽出精製するための改良酵素法を開発し、拡充したプライマーを用いて原料米の品種や産地の判別のための基本技術を開発した。日本酒についても DNA 判別技術を開発中である。

オ　今後の課題

米加工製品からの DNA 抽出精製方法の改良、プライマーの拡充を行い、外国産の米及び米加工製品について検討を加える。醸造酒の原料植物判別技術の改良を行う。

カ　要　約

(ｱ) PCR 用の有用プライマーを拡充した。

(ｲ) 各種の米加工製品からの PCR 用鋳型 DNA 抽出・精製技術を開発し、原料米の品種や新潟県産コシヒカリ（産地）の判別が可能であることを示した。

(ｳ) 日本酒等、醸造酒を試料とする原料植物判定技術の開発を開始し、試料前処理技術として、凍結乾燥法で最良の結果が得られた。PCR 用鋳型 DNA の醸造酒からの抽出・精製技術の開発を行い、代表的酒米の判別例が得られた。

キ　引用文献

中村澄子・大坪研一・鈴木啓太郎・原口和朋 2006. 6. 特許出願. 特願 2006-169336.

研究担当者（大坪研一*、中村澄子、鈴木啓太郎）

2　コンニャクの品種判別技術の開発

ア　研究目的

コンニャクは、ダイエット健康食品やおでんその他料理に幅広く利用され、国民生活に欠かせない。また、クローン作物であることから、我が国で開発された優良品種の種芋が海外に流出し製品として逆輸入されることも憂慮されている。しかし、コンニャクは加工過程での加熱および物理的破砕が厳しいことに加え、ゲノムサイズが非常に大きいことから、多型解析が困難であった。そこで、本研究では、まず国内の主要栽培品種における多型マーカーを多数検出し、次に PCR による DNA 品種鑑定法を開発することを目的とした。

イ　研究方法

(ｱ) 育成品種4品種（あかぎおおだま、はるなくろ、みょうぎゆたか、みやままさり）および国内栽培系統4系統（在来種、支那種グループ）、近縁種 1 系統（自生地インドネシア）を供試した。

(ｲ) 制限酵素ランドマークゲノムスキャニング（RLGS）法等を用いて、各品種系統における多型スポットを検出し、品種識別のための遺伝子型プロファイルを作成した。

(ｳ) すでに検出している「あかぎおおだま」と「みやままさり」の RLGS 多型マーカーの STS 化を試みた。

ウ　研究結果

(ｱ) NotI-EcoRI-BamHI の組み合わせを用い、あかぎおおだま、みょうぎゆたかで明瞭な87個のスポットを比較したところ、2 品種共通なスポットが64個、

みょうぎゆたか特異的なスポットが17個、あかぎおおだま特異的なスポットが6個検出された（図1202-1）。これら合計23スポット(27%)は品種識別マーカーとして非常に有用であると考えられる（表1202-1）。

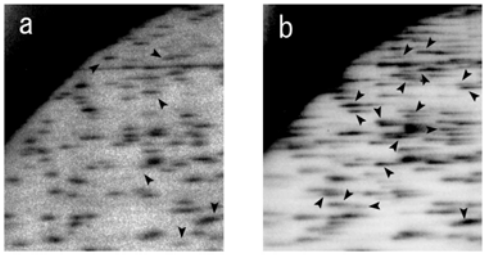


図1202-1　品種間での RLGS 多型検出
a：あかぎおおだま、b：みょうぎゆたか
品種間で違いのあるスポットを矢印で示す

表1202-1　コンニャク品種間多型の検出

制限酵素	共通スポット	特異的スポット			解析スポット
		あかぎおおだま	みょうぎゆたか	計	総数
*Not*I-*Eco*RI-*Bam*HI	64	6	17	23 (26%)	87

(ｲ) RLGS 二次元ゲルから、スポット部位の DNA 断片を切り出し、シークエンスを行った結果、２つの多型マーカーをクローニングすることができた。これらの STS 化プライマーを設計し、育成品種 4 品種、国内栽培系統 4 系統、近縁種 1 系統に適用した結果、多型が確認された。

(ｳ) さらに多型マーカーを開発するために、育成品種 4 品種(あかぎおおだま、はるなくろ、みょうぎゆたか、みやままさり)を材料として、蛍光二次元ゲノム比較解析（FRGP）を行った。その結果、23 個の多型マーカーを検出し、それらの遺伝子型プロファイルは 11 のパターンに分類された（表 1202-2)。

表1202-2　4 品種における変異 FRGP スポットの分類

パターン番号	ＦＲＧＰスポットの変異パターン				スポット数	特異性
	G	A	M	H		
Ｐ１	○	○	○	×	1	H
Ｐ２	○	○	×	○	2	M
Ｐ３	○	○	×	×	1	
Ｐ４	○	×	○	○	2	A
Ｐ５	○	×	○	×	1	
Ｐ６	○	×	×	○	1	
Ｐ７	○	×	×	×	3	G
Ｐ８	×	○	○	○	5	G
Ｐ９	×	○	○	×	3	
Ｐ１０	×	×	○	○	1	
Ｐ１１	×	×	○	×	3	M
計					２３	

G：みやままさり、A：あかぎおおだま、M：みょうぎゆたか、H：はるなくろ、○：スポット有、×： スポット無

エ　考　察

(ｱ) これまでの、イグサの品種鑑定マーカーの開発で得られたノウハウを利用して、コンニャクにおける多型検出技術に関わる基本的な技術を開発した。

(ｲ) 本研究により、コンニャクの主要育成品種4品種において、２次元電気泳動分析により多型マーカーが得られた。高分子 DNA が得られれば、本分析手法を直接適用することにより、4品種の品種鑑定が可能となった。

(ｳ) 今回得られた多型マーカーのうち、２例について STS 化することに成功した。これにより、今後 2 次元電気泳動分析によって効率的に多型マーカーを検出し、それを STS 化することで、多数の品種鑑定 STS マーカーを得ることが可能になった。

(ｴ) 以上の成果を踏まえ、今回コンニャクで開発された技術が他の農産品の多型マーカー開発やクローン品種の多型検出への応用の可能性も示された。

(ｵ) 本研究の実験の一部は、群馬県農業技術センターとの共同研究で農林水産技術会議事務局筑波事務所農林交流センター施設を利用して実施された。
農林交流センターでは、「農林水産物の品種鑑定を目的としたゲノム解析技術」の放射線実験講習会を本課題担当者を講師として開催している。これにより、本研究の成果の技術普及が図られると期待される。

オ　今後の課題

(ｱ) 今後、主要育成品種 4 品種で検出された RLGS マーカーの塩基配列情報を解析し、STS 化プライマー作成を推進する必要がある。また、加工段階で壊れた DNA を鋳型とした場合でも品種判別を可能にするため、プライマーの最適化を検討することも重要である。

(ｲ) また、今後在来種、支那種、備中種、近縁種など合計30品種を対象に多型マーカーを開発する方針である。

(ｳ) さらに、群馬県農業技術センターと共同で、加工品からの DNA 抽出法および STS 化マーカーを用いた多型検出法のマニュアル化を行い、協力機関と妥当性確認を実施したい。

カ　要　約

(ｱ) コンニャクの育成品種4品種(あかぎおおだま、はるなくろ、みょうぎゆたか、みやままさり)、および国内栽培系統4系統（在来種、支那種グループ)、近縁種1系統(自生地インドネシア)を供試し、二次元電気泳動法を用いて各品種系統における多型スポットを検出し、合計46スポットの多型マーカーを得た。

(ｲ) RLGS 多型スポットについては2マーカーのクローニングに成功し、STS マーカーとして9品種・系統で多型を確認した。

キ　引用文献

1) 飯塚弘明ら2005. コンニャクにおける RLGS 品種識別マーカーの開発. 日本 DNA 多型学会第14回学術集会抄録集.：78（11月24～25日、前橋市群馬会館).

2) 山下秀次ら2005. 蛍光二次元ゲノム比較解析法によるコンニャクの品種特異的ゲノム差異の検索. 日本 DNA 多型学会第14回学術集会抄録集.：42（11月24～25日、前橋市群馬会館).

3) 奥泉久人ら 2005. イグサ品種の DNA 多型マーカーの開発. DNA 多型. 13：77-79.

4) Okamoto H. et al. 2006. Development of a New Cultivar-Discrimination Method Based on DNA Polymorphism in a Vegetatively Propagated Crop. JARQ. 40：65-69.

5) 山川直美ら 2005. ニワトリにおける多型検出法の開発. DNA 多型. 13：116-119.

6) 大竹祐子ら 2005. 植物クローンの RLGS 多型検出技術の開発. DNA 多型. 13：62-64.

研究担当者（奥泉久人*）

3　コンニャク加工製品における品種判別の検証

ア　研究目的

コンニャクは近年の製品輸入の増大にともなう生産物価格の低迷で、栽培面積・自給率ともに減少傾向にある。群馬県では産地を振興するために低コスト・高収益生産を目指して2005年に新品種「みやままさり」を品種登録した。クローン作物であるコンニャクの品種育成者権を守り、精粉として加工された製品段階の輸入品と国産品を識別するために、簡便で迅速な品種鑑定が欠かせない。そこで精粉からの DNA 抽出法と DNA 品種鑑定法を開発し、実用化を図ることを目的とした。

イ　研究方法

(ｱ) 材　料

コンニャク供試材料は群馬県農業技術センターこんにゃく特産研究センターで育成した「あかぎおおだま」および「みやままさり」を用いた。

(ｲ) RLGS 分析の方法

球茎の頂芽内にある幼植物体を材料に、CTAB 法でゲノム DNA を抽出した。得られたコンニャクゲノム DNA を *Bsp*EI で消化し、この末端に放射性同位元素(^{32}P) を取り込ませて標識、電気泳動に供した。電気泳動は0.8％アガロースゲルで1次元目の電気泳動を行った後、泳動後のアガロースゲルを *Hin*dⅢ溶液に浸し、ゲル中で DNA を消化、5 ％ポリアクリルアミドゲル上に接続、2 次元目の電気泳動を行った。電気泳動後のゲルを乾燥させ、フジ BAS2000システムを用いてオートラジオグラフィーを行って、RLGS パターンを得た。この RLGS パターンからコピー数が多いスポットを選定し、クローニングに用いた。

(ｳ) オルガネラ由来 DNA 検出用プライマーのクローニング

オートラジオグラフィーと乾燥したアクリルアミドゲルを重ね合わせ、目的とするスポットを打ち抜き、このゲルから DNA を回収し、PCR を用いて目的断片のみを増幅し、塩基配列解析に供した。得られた塩基配列データから、このスポットを特異的に増幅するプライマーを設計、合成した。

(ｴ) 精粉からの DNA 抽出法の検討

精粉(グルコマンナン粒子で製品原料)からの DNA 抽出に適した方法を調べるために、比較的 DNA の取りやすい飛粉（デンプン等の不純物で、精粉よりも

DNA を多く含む）を材料に CTAB 法および Genomic-tip（QIAGEN）を用い DNA を精製し、収量および品質を比較した。

飛粉からの DNA 抽出は、飛粉0.3g を材料とした。精粉からの DNA 抽出は精粉2.0g に10ml 10mM Tris-HCl pH7.5を加え 5 分間静置した後、3,000×g で15分間遠心して得た上清を材料とした。DNA 抽出は CTAB 法および Genomic-tip で行った。

得られた DNA を鋳型に、コンニャク DNA 検出用プライマー（C2プライマー）および品種判別用プライマー（30b プライマー(独)農業生物資源研究所開発）を用いて PCR 反応を行い DNA の有無を確認するとともに、抽出条件の検討を行った。

(ｵ) 加工強度を変えた精粉の調製

秋に収穫した「あかぎおおだま」「みやままさり」の健全な球茎約100kg をコンニャク生芋スライサーを用いて短冊状に切断し、45～48℃で通風乾燥し荒粉(切り干し)を調製した。この荒粉を原料加工業者の工場に持ち込み、搗臼式精粉機を用いて搗精し、精粉を得た。この精粉をさらにセパレーターで処理し、飛粉を除去、加工強度別精粉の調製材料とした。

精粉の加工強度はターボミルを使用した研磨工程の回数によって 1 回から 4 回処理までの 4 段階調製した。材料の精粉をターボミルに投入し、ターボミル内での研磨工程を経て機外に排出された精粉をターボミル 1 回処理精粉として採取、この精粉を再度ターボミルに投入し、4 回処理までの精粉を調製した。

調製した 5 種類の加工強度別精粉から Genomic-tip を用いて DNA を抽出し、C2プライマーおよび30b プライマーを用いて PCR 反応を行い DNA の有無を確認するとともに、検出限界の検討を行った。

ウ　研究結果および考察

(ｱ) コンニャク DNA 検出葉マーカーの開発

RLGS 分析の結果、*Bsp*EI-*Hin*dⅢの組合せで 2 次元展開することで、オルガネラに由来すると思われる約50個のスポットを得た。これらのうち明瞭な 2 つのスポットを打ち抜き、クローニング、塩基配列を決定したところ、これらは葉緑体とミトコンドリア DNA に由来するスポットであることが判明した。

塩基配列からこれらを特異的に増幅するプライマーを設計し、コンニャク DNA を鋳型に PCR 反応を行ったところ、葉緑体 DNA 由来プライマー(C2プライマー)の増幅効率が高く、検出感度が優れておりコンニャク DNA の検出に有効であることが判明した(図1203-1)。

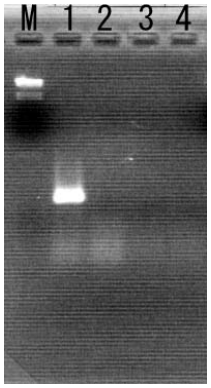


図1203-1　オルガネラ由来のプライマーによる PCR 増幅産物
1：C2プライマー増幅産物(葉緑体 DNA 由来)
2：C2プライマーネガティブコントロール
3：M1プライマー増幅産物(ﾐﾄｺﾝﾄﾞﾘｱ DNA 由来)
4：M1プライマーネガティブコントロール

(ｲ) 精粉からの DNA 抽出法の検討

飛粉を材料に CTAB 法および Genomic-tip で精製した DNA を鋳型として、C2プライマーと30b プライマーを用いて増幅した PCR 産物を電気泳動で比較したところ、C2プライマーでは CTAB 法、Genomic-tip ともに高効率で増幅されていた。一方、30b プライマーでは Genimic-tip に比べ CTAB 法での増幅効率が悪くバンドが不明瞭であった（図1203-2）。このことから Genomic-tip の方が収量、品質ともに優れることが判明した。

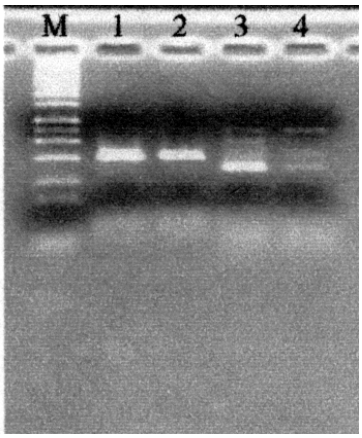


図1203-2　Genomic-tip および CTAB 法抽出 DNA による PCR 増幅産物
1:Genomic-tip C2プライマー増幅産物
2:CTAB 法　C2プライマー増幅産物
3:Genomic-tip 30b プライマー増幅産物
4:CTAB 法　30b プライマー増幅産物

精粉からの DNA 抽出では Genomic-tip を用いることで、C2、30b プライマーともに検出が可能であった。(図1203-3)

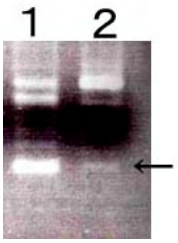


図1203-3　Genomic-tip を用いて精粉から抽出した DNA による PCR 増幅産物
1: 飛粉由来 DNA を鋳型とした PCR 幅産物
2: 精粉由来 DNA を鋳型とした PCR 幅産物
30b プライマーを使用

(ｳ) 加工強度別精粉を使った検出感度の検証

ターボミルによる研磨工程を 1 回処理から 4 回処理までの4種類の精粉から抽出した DNA を鋳型に C2 プライマーおよび30b プライマーで検出感度を比較したところ、C2プライマーは PCR 反応38サイクルで 1 回処理から4回処理まで検出可能であった(図1203-4A)。

バンドは1回処理が最も濃く、2 回～ 4 回処理ではやや薄くなったが、加工強度が高くても検出可能であった。

一方、30b プライマーは C2プライマーに比べると検出感度が低く、38サイクルではバンドが検出できず、45サイクルまで反応回数を増加すると検出可能であった(図1203-4B)。バンドはターボミル 1 回処理、4 回処理が検出されたが、2 回処理、3 回処理では明瞭なバンドが検出できなかった。

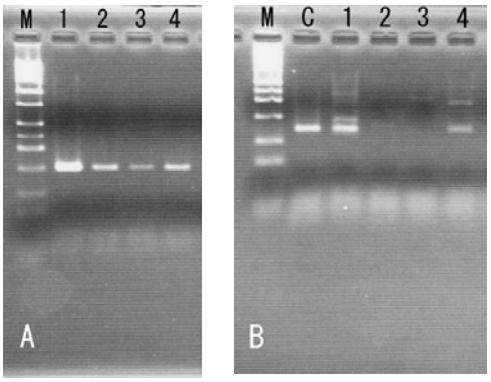


図1203-4　加工強度の違いによる検出感度
写真Ａ：C2プライマー　写真Ｂ：30b プライマー
M：サイズマーカー　C:ポジティブコントロール
１：ターボミル1回処理　2：ターボミル2回処理
３：ターボミル3回処理　4：ターボミル4回処理

ターボミル 2 回、3 回処理で検出できず、より加工強度の高い 4 回処理でバンドが検出された理由としてはターボミル内で生じるコンタミが原因と考えられる。これは 1 回処理の精粉がターボミルの機内に残留し、4 回処理の精粉に微量にコンタミしたと想定される。加工業者ではターボミルを分解清掃することは非常にまれで、通常は連続して加工を行うためコンタミは避けられない。逆にこれはターボミルによる研磨ではコンタミが必ず生じるので、どんなに加工強度を高くしても検出が可能であることを示唆している。

エ　今後の課題

精粉からの DNA 抽出が可能であることが明らかになったが、まだ回収効率が低くさらに改良が必要である。また、品種判別を行う際に用いる STS 化プライマーは核ゲノムを鋳型とするためコピー数が少なく検出が難しい。今後開発したマーカーを用い、検出限界を慎重に検討し、検出限界の向上を図る必要がある。

精粉からさらに加工が進んだ板コンニャクは、アルカリ処理の工程を経ているため、DNA 鑑定が極めて困難であると考えられるが、この可能性について検討する。

オ　要　約

コンニャク精粉の膨潤を抑え、かつダメージの大きい微量の DNA を効率よく抽出する条件の最適化を行った結果、Genomic-tip(QIAGEN)を採用することで高品質な DNA が安定して得られることがわかった。また、精粉の加工強度(研磨工程の強さ:ターボミル 1 回から 4 回処理)別に DNA の検出限界を検討することにより、コンニャクにおける DNA 鑑定技術の信頼性にかかわる基礎的なデータが得られた。

カ　引用文献

1) 飯塚弘明ら2005. コンニャクにおける RLGS 品種識別マーカーの開発. 日本 DNA 多型学会第14回学術集会抄録集.: 78 (11月24～25日、前橋市群馬会館).

2) 山下秀次ら2005. 蛍光二次元ゲノム比較解析法によるコンニャクの品種特異的ゲノム差異の検索. 日本 DNA 多型学会第14回学術集会抄録集.: 42 (11月24～25日、前橋市群馬会館).

研究担当者(飯塚弘明*)

4　小麦加工製品の品種判別技術の開発

ア　研究目的

国内産小麦は安全性の観点から需要が増加している作物の一つである。地域独自の品種の開発と利用が増加するに伴って、それらの原材料表示を証明する技術の開発が求められるようになった。小麦はめんやパン、菓子のように加工された状態で市場に流通することが多いため、加工時の作業性の良さやコスト低下のために輸入小麦を混ぜたにも関わらず、それらを使った商品を国産の特定品種100％使用と表示する等の問題が発生している。そのため、加工製品でも品種判別が可能な DNA マーカーを開発し、PCR 法を用いた小麦の品種判別技術を確立することを目的とした。

イ　研究方法

(ｱ) 小麦加工製品からの DNA 抽出と DNA 断片化程度の評価

DNA 抽出キットである QIAGEN Genomic-tip と Genomic DNA Buffer Set (QIAGEN 社)を用いて添付のプロトコールに従い、市販の加工製品 8 種類(クッキー 2 種類、クラッカー、パン、うどん加熱前・加熱後、パイ、小麦粉)から DNA の抽出を行った。小麦の Dihydroflavonol-4-reductase 遺伝子の塩基配列をもとにして、小麦特異的に増幅する 5 組の PCR プライマー(増幅長92bp、288bp、489bp、968bp、1498bp)を設計した。これらを用いて、加工製品から抽出した DNA をテンプレートとした場合に安定的に PCR 増幅が可能な増幅長を評価した。

(ｲ) 低分子グルテニン・サブユニット(LMW-GS)の遺伝子型判定による品種判別

小麦の種子貯蔵タンパク質の一種である LMW-GS を 2 次元電気泳動法(IEF x SDS-PAGE)を用いて単離し、LMW-GS 遺伝子座(*Glu-A3*, *Glu-B3*, *Glu-D3*)の品種間差異を明らかにするとともに、個々の遺伝子を増幅する PCR プライマーを設計した。これらの遺伝子型の組み合わせによって、国内で用いられている主要めん用品種(さぬきの夢2000、チクゴイズミ、シロガネコムギ、農林61号、Arrino、Calingiri)の判別を試みた。

(ｳ) 単純反復配列 (SSR : Simple Sequence Repeat)多型検出による品種判別

データベース(NCBI)に登録されている小麦の発現遺伝子情報 (EST : Expressed Sequence Tag)を利用して、SSR マーカー開発支援プログラム read2Marker1)により SSR を指標とした PCR プライマーの設計を行った。各品種の種子から DNA の抽出を行い、テンプレートとした。それらを用いて、国内に流通する57品種について、増幅長の差異による品種判別を試みた。

ウ　研究結果

(ｱ) アガロースゲル電気泳動によって各サンプルから抽出したゲノム DNA の状態を調べたところ、小麦粉以外の加工製品で DNA の断片化が進んでいることが確認された[2)](図1204-1)。各サンプルから抽出した DNA すべてにおいて PCR 増幅が可能であり、安定的に検出できる増幅長は92bp および288bp であった(表1204-1)。小麦粉から抽出した DNA のみ 5 組の PCR プライマーすべての増幅が確認された。

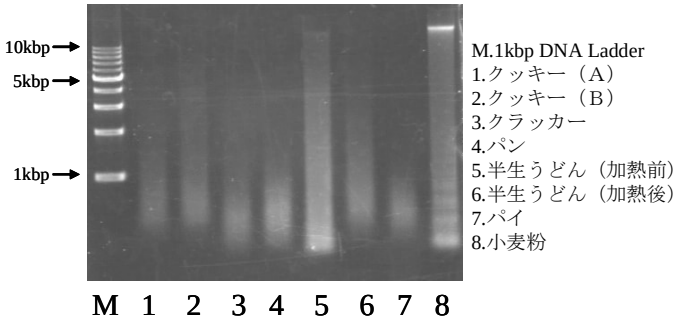


図1204-1　小麦加工製品から抽出した DNA の電気泳動図(１％アガロースゲル)

表1204-1　8種類の小麦加工製品から抽出した DNA の PCR による限界増幅長の評価

(○：増幅可　×：増幅不可)

	増幅長				
市販加工製品	92bp	288bp	489bp	968bp	1498bp
①クッキー(A)	○	○	○	×	×
②クッキー(B)	○	○	○	×	×
③クラッカー	○	○	○	×	×
④パン	○	○	○	×	×
⑤半生うどん　加熱前	○	○	○	○	○
⑥半生うどん　加熱後	○	○	○	○	×
⑦パイ	○	○	×	×	×
⑧小麦粉	○	○	○	○	○

(ｲ) 主要めん用 6 品種について、LMW-GS を 2 次元電気泳動法を用いて単離し、品種間差異を明らかにした(図1204-2)。個々のスポットに対応する遺伝子を DNA マーカー化し、遺伝子型(*Glu-3*)の判定を行っ

た結果、「さぬきの夢2000」、「農林61号」、「Arrino」は他の3品種とはそれぞれ異なる遺伝子型を示し、簡便に判別可能であった[3)](表1204-2)。

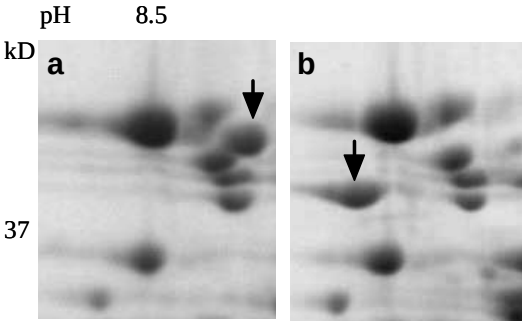


図1204-2 LMW-GSの2次元電気泳動法による小麦品種の判別　a：さぬきの夢2000; b：Calingiri
矢印：品種特異的な *Glu-A3*のスポット

表1204-2 主要めん用品種のLMW-GS遺伝子型

品　種	*Glu-A3*	*Glu-B3*	*Glu-D3*
さぬきの夢2000	c	i	a
チクゴイズミ	d	i	a
シロガネコムギ	d	i	a
農林61号	d	i	c
Arrino	c	b	c
Calingiri	d	i	a

(ウ) SSRの繰り返し数が合計11以上を含む断片を増幅させるよう設計された118組のプライマーを選択し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により国内外の小麦21品種間でPCR増幅を確認し、多型を解析した。同時に、小麦特異的に増幅するマーカーを選抜するため、稲、大麦での増幅の有無を調査した。小麦特異的に多型が認められた34マーカーのうち、アガロースゲル電気泳動法を用いて検出できる4マーカーの組み合わせによって、国内流通57品種（国内品種40、国外品種17）のうち20品種を個別に判別し、37品種を11グループに分類することが可能であった(表1204-3　図1204-3)。

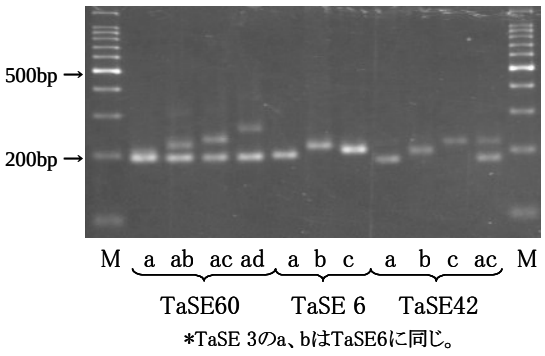


図1204-3 4組のSSRマーカーによるアガロースゲル電気泳動図
（記号は表1204-3に対応，M:100bp DNA Ladder）

表1204-3 4組のSSRマーカーのアガロースゲル電気泳動法を用いた多型組み合わせによる小麦の品種判別

マーカー				品種名
TaSE60	TaSE6	TaSE42	TaSE3	
a	a	–		ゆきちから
		ac		つるぴかり、ニシノカオリ、イワイノダイチ、ダイチノミノリ、バンドウワセ、キヌヒメ
		c	a	Aroona
			b	ハルユタカ
	b	–		ユメアサヒ
		a		春のかがやき、Eradu
		ac		春よ恋、あやひかり、ニシホナミ、さぬきの夢2000、きぬの波、きぬあずま、きぬいろは、農林26号、シラサギコムギ
	c			Eltan
	ab			Arrino
ab	a	–		タクネコムギ
		a	a	CDC Teal
			b	AC Barrie
		ac		シラネコムギ、ダブル8号
		c		ココユキコムギ
	b	–	a	キタカミコムギ
			b	Calingiri
		c		Cadoux
	c	–	a	Hyak
			b	Alturas
		a		しゅんよう、Glenlea
		b		Tyee
		ac		Lewjiain
ac	a	–	a	タイセツコムギ、ナンブコムギ
			b	ホロシリコムギ、キタノカオリ
		ac		農林61号、シロガネコムギ、ミナミノカオリ、アブクマワセ、タマイズミ
		c		Eden
	b	–	a	ホクシン、チホクコムギ
			b	きたもえ、White Bird、Jubilee
		a		ネバリゴシ
		ac		チクゴイズミ、ふくさやか
ad				Zak

エ　考　察

PCR増幅が可能な増幅長を比較すると、短いものから、［パイ］、［クッキー(A)・クラッカー・パン］、［クッキー(B)・半生うどん(加熱後)］、［半生うどん(加熱前)・小麦粉］の順であり、高温で加熱した製品ほど断片化が進んでいると推測された。これらの結果から、DNAの断片化の程度は異なるものの、様々な小麦粉食品からDNAが抽出でき、300bp

以下の PCR 増幅は可能であると考えられる[2),4)]。

また、開発した DNA マーカーは、PCR 法と操作が簡便なアガロースゲル電気泳動法によって判別が可能なため、比較的、場所や実験者を問わず使用でき、実用的な技術である。SSR マーカーについては、(ア)の結果を受けて増幅長を300bp 以下に設定しており、DNA の断片化が著しい加工製品での品種判別にも対応可能であると考えられる。

オ　今後の課題

市場に流通している国内の小麦品種は遺伝的に近縁であるものが多く、今回報告した DNA マーカーを使用しても、複数の品種で遺伝子型が一致してしまう場合が多い。すべての品種を個々に判別できるように、さらに DNA マーカーの数を増やす必要がある。また、育成後、長い期間が経過した古い品種や栽培地域が広範囲に及ぶ品種については、同一品種でも異なる遺伝子型を示すことが報告されている[5),6)]。品種の純度の変異を念頭に置き、これらの技術を利用する必要があると考えられる。また今後、実際に加工製品を用いて、これらの DNA マーカーの実証を行っていく必要がある。

カ　要　約

DNA が断片化している小麦加工製品でも適用可能な DNA マーカーについて検討を進めたところ、300bp 以下の増幅長となるマーカーの作成が必要であることを明らかにした。主要めん用 6 品種について、LMW-GS を 2 次元電気泳動法を用いて単離し、品種間差異を明らかにした。個々のスポットに対応する遺伝子を DNA マーカー化し、アガロースゲル電気泳動法により遺伝子型の判定を行った結果、「さぬきの夢2000」、「農林61号」、「Arrino」は個々に判別可能であった。また、小麦の EST 情報から SSR マーカーを開発し、4 組のマーカーを用いてアガロースゲル電気泳動法により国内に流通する57品種の判別およびグループ化が可能となった。

キ　引用文献

1) Fukuoka, H. *et al.* (2005) read2Marker : a data processing tool for microsatellite marker development from a large data set. BioTechniques. 39 : 472-476.

2) 藤田由美子ら(2005) 小麦加工食品の原料品種判別法の開発　Ⅰ. 加工食品からの DNA 抽出法および DNA 断片化程度の評価. 育種学研究7(別1・2号) : 909.

3) 池田達哉ら(2005) 小麦品質改良のための種子貯蔵蛋白質遺伝子の研究 VII. 低分子量グルテニン・サブユニット遺伝子型の分類とその DNA マーカー化. 育種学研究7 (別1・2号) : 255.

4) Michael Tilley (2004) PCR Amplification of Wheat Sequences from DNA Extracted During Milling and Baking. Cereal Chem, 81 (1) : 44-47.

5) 小林俊一・吉田智彦 (2006) RAPD 分析による栃木県を中心とした関東周辺地域のムギ類優良品種識別. 日本作物学会紀事, 75(2), 165-174.

6) Daniel J.Perry. (2004) Identification of Canadian durum wheat varieties using a single PCR. Theor.Appl.Genet. 109 : 55-61.

研究担当者(藤田由美子*、池田達哉)

5　小麦粉及び麺における品種判別法の検証

ア　研究目的

近年、消費者の安全性志向の高まりから、パン用、麺用ともに国産小麦の需要が増大している。また、各地において地域独自の小麦品種開発とその利用が推進されており、「国内産小麦使用」などと表示することにより、差別化、高付加価値化を図る動きも活発化している。

一方、市場においては、小麦は加工された製品として出回ることが多く、原材料となる小麦品種の判別が困難であり、商品の表示を偽り販売される事例も散見される。

このため、表示の適正化や食の安全・安心に対する信頼性の確保に向け、麺をはじめとする小麦加工品等の原材料を科学的で迅速簡便に判別する技術の開発などが強く求められている。

本研究においては、このような情勢を背景に、グルテニンタンパクや DNA マーカーを利用した小麦粉及び麺製品 (乾麺、生麺、ゆで麺など)、さらには種々の加工工程を経た小麦加工製品における品種判別法を検証する。

イ　研究方法

(ア) グルテニンタンパク*1による品種判別

a　SDS-PAGE*2による品種判別

(a) 小麦粉段階での品種別泳動パターン

麺用に用いられる主要 8 品種の小麦粉を供試した。各品種の小麦粉20mg からグルテニンを抽出し、

SDS-PAGE でサブユニットを分離した。泳動条件はミニゲル（90×110×1mm）、10mA/gel で 8 時間とし、CBB-G250染色で検出した。

(b) 小麦粉段階において他品種が混入した場合の検出感度

「さぬきの夢2000」と「農林61号」の混合割合の異なる小麦粉を調製し、グルテニンを SDS - PAGE で分離した。泳動条件はスタンダードゲル(138×130×1mm)、20mA/2gel で 1 時間、その後50 mA/2gel で 6 時間30分とし、CBB-G250染色で検出した。肉眼により混入の有無が確認できる割合を調査した。

(c) 生麺及び茹で麺段階での泳動パターン

「さぬきの夢2000」、「農林61号」、「ASW」を用い麺を調製した。凍結乾燥して粉体にした後、上述の(a)の方法により分離・検出した。

(d) 種々の加工段階を経た小麦加工製品の泳動パターン

小麦加工品の範囲を麺以外にも広げ、パイ、サブレ、カレールウ、シチュールウ、醤油の市販製品を供試し、上述の(b)の方法により泳動パターンをみた。

b　市販キットによる品種判別

分析技術の平準化を図るため、市販キット（F・システム;アトー社製)を用いる方法について検討した。

(a) 小麦粉段階での品種別泳動パターン

国内で麺用に用いられる主要12品種の小麦粉を供試し、当該キットの取扱説明書に従い、分離、検出した。

(b) 小麦粉段階において他品種が混入した場合の検出感度

「さぬきの夢2000」と「ASW」の混合割合の異なる小麦粉からグルテニンタンパクを抽出し、当該キットにより分離、検出した。

(c) 市販キットを用いた品種判別マニュアルの試作

F・システム（アトー社製）を用いる方法のマニュアル化について検討した。

(イ) DNA マーカーによる品種判別

a　小麦粉及び小麦加工品からの DNA 抽出法の検討

(a) 小麦粉及び生麺、茹で麺からの DNA 抽出の改良

DNA の抽出効率を上げるため、従来 DNA 抽出に汎用されている CTAB 法を基本として改良を加えた。

(b) 市販キットによる DNA 抽出の効率化

各種小麦加工品からの DNA 抽出法の平準化を図るため、市販のキット（DNeasy Plant Mini Kit ; QIAGEN 社製）による DNA 抽出法について検討した。

b　加工工程による DNA の断片化

小麦粉、生麺、茹で麺、パイを用いて、加工工程による DNA の断片化を確認した。DNA 抽出は上述の(a)の方法によった。

c　品種判別に有効な多型を示すプライマーの検証

（独）近畿中国四国農業研究センターで開発されたプライマーを中心に PCR を行い、品種判別に有効な多型を示すものの検索を行った。DNA 抽出は上述の(a)の方法によった。

*1：グルテニンとは、麺の弾性に関与するタンパク質の一つ。

*2：SDS-PAGE とは、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動のことで、分子量サイズでタンパク質を分画する方法。

ウ　研究結果

(ア) グルテニンタンパクによる品種判別

供試した 8 品種についてグルテニンの高分子量サブユニット（HMW-GS）と低分子量サブユニット（LMW-GS）の泳動パターンを比較することにより、品種を判別することが可能であった。「さぬきの夢2000」とその母親「ニシホナミ」のように HMW-GS の構成が同一である場合も、LMW-GS のパターンと組み合わせて比較することにより判別が可能であった（写真1205-1)。

「さぬきの夢2000」と「農林61号」では HMW-GS の泳動パターンが異なるため、品種固有のバンドの有無により混入割合の検出限界をみたところ、「さぬきの夢2000」に混在する「農林61号」の検出限界は 5 %程度であることが確認できた（写真1205-2)。

生麺や茹で麺においても判別は可能であった。ただ、茹で麺では、低分子領域の像が濃くなる傾向がみられた（写真1205-3)。

各種麺類、パイ、シチュールウ及びカレールウについては HMW-GS、LMW-GS とも泳動パターンを確認できた。しかし、サブレは LMW-GS しか確認できず、醤油はいずれのサブユニットの確認も困難であった（写真1205-4)。

市販キットを用いる方法においても、これまでの SDS-PAGE 法と同様に国内主要品種の判別が可能であることを確認した（写真1205-5)。しかし、HMW-GS の泳動パターンによる判別の結果、「さぬきの夢

2000」に混在する「ASW」の検出限界は10%程度であり、市販キットではこれまでの SDS-PAGE 法に比べて精度がやや劣った（写真1205-6）。

F・システムを用いる方法について、分析の妥当性を確認できるようマニュアルを試作した。

(ｲ) DNA マーカーによる品種判別

DNA 抽出には、CTAB バッファーにプロティナーゼKを添加し、65℃で20分間処理する簡易 CTAB 法により、小麦粉及び生麺、茹で麺のいずれからも高い純度の DNA が2.5時間程度で得られた(図1205-1)。さらに市販キットに酵素処理を組み合わせることにより、上述の簡易 CTAB 法よりも高純度でかつ充分量の DNA が得られた。糖・脂肪高含量の加工品は、試料の CIA 前処理が必要であった（表1205-1)。

各種加工製品から抽出した DNA を電気泳動したところ、加工が進むにつれて DNA の断片化が進んでいた。パイでは300～400bp に断片化していた（写真1205-7)。

低分子グルテニンの一つをコードしている *Glu-A3* 遺伝子の型を検出するプライマーで PCR を行ったところ、パイ以外の加工製品について、予想された850bp 付近にバンドが確認できた (写真1205-8)。「さぬきの夢2000」と「ホクシン」(A3-e)、「農林61号」(A3-d)、「シロガネコムギ」(A3-d)等主要麺用品種ではバンドパターンが異なり、「さぬきの夢2000」への異品種の混入が検出できた（15, 16レーン)。打ち粉に「ASW」を用いた「さぬきの夢2000」100%麺では、生麺、茹で麺ともに「ASW」由来のバンドは検出されなかった (18, 19レーン)。パイでは検出できなかった（レーン22)。

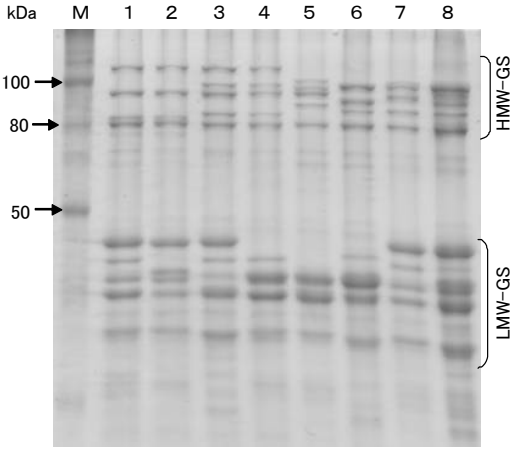


写真1205-1　SDS-PAGE による主要麺用品種のグルテニンサブユニットの電気泳動像

M：MWM、１：ニシホナミ、２：さぬきの夢2000
３：農林61号、４：チクゴイズミ、５：ホクシン
６：Arrino、７：Calingiri、８：ＡＳＷ

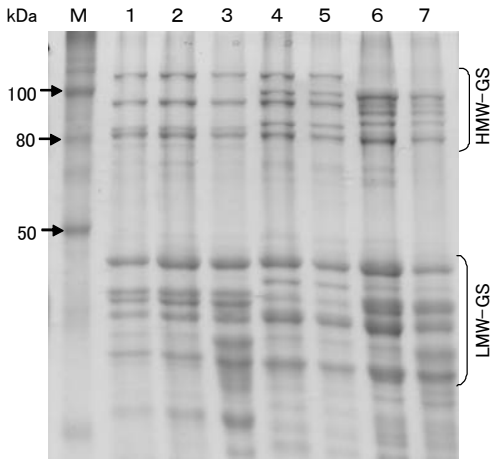


写真1205-3　小麦粉及び麺におけるグルテニンサブユニットの電気泳動像

M：MWM、１：さぬきの夢2000（小麦粉)、２：さぬきの夢2000（生麺)、３：さぬきの夢2000（茹で麺)、４：農林61号（小麦粉)、５：農林61号（茹で麺)、６：ＡＳＷ（小麦粉)、７：ＡＳＷ（茹で麺）

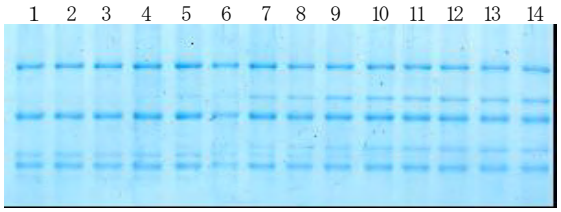


写真1205-2　SDS-PAGE による小麦２品種の混合割合別電気泳動像

（さぬきの夢2000：農林６１号、%）
１；100：0、　２；99.5：0.5、３；99：1
４；95：5、　５；90：10、　６；80：20
７；70：30、　８；60：40、　９；50：50
10；40：60、　11；30：70、　12；20：80
13；10：90、　14；0：100

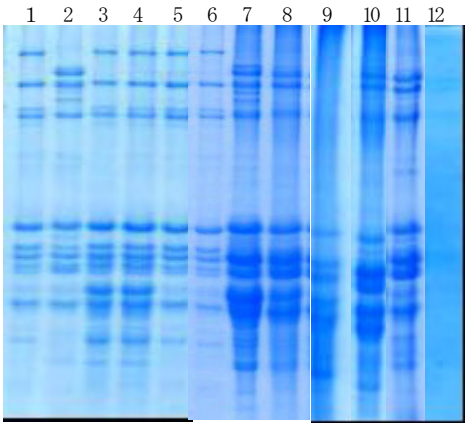


写真1205-4　各種小麦加工品におけるグルテニンサブユニットの電気泳動像

１；粉(さぬきの夢2000)、２；粉（ＡＳＷ)
３；冷凍麺、４；ゆで麺、５；生麺、６；乾麺
７；油揚げ麺、８；パイ、９；サブレ、
10；カレールウ 11；シチュールウ、12；醤油

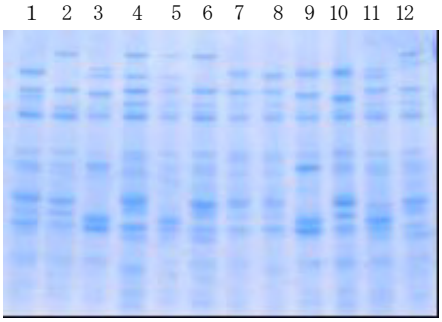


写真1205-5　市販キット利用による ASW 及び国内主要小麦品種の電気泳動像

1；ＡＳＷ　　2；さぬきの夢2000
3；ホクシン　　4；農林61号
5；チクゴイズミ　　6；シロガネコムギ
7；シラネコムギ　　8；バンドウワセ
9；チホクコムギ　　10；ハルユタカ
11；ナンブコムギ　　12；ふくさやか

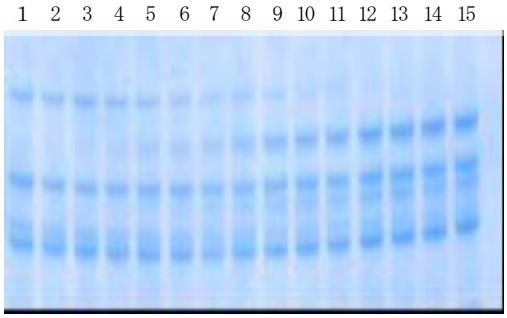


写真1205-6　市販キット利用による小麦２品種の混合割合別電気泳動像

（さぬきの夢2000：ＡＳＷ、%）
1；100：0、2；97：3、 3；95：5
4；90：10、5；80：20、6；70：30
7；60：40、8；50：50、9；40：60
10；30：70、11；20：80、12；10：90
13； 5：97、14； 3：97、15；0：100

小麦粉、麺*　0.05g
↓ ２×CTAB buffer　180μl
２%SDS、２%PVPP
プロテイナーゼ K（20mg/ml）20μl
▼ １×CTAB buffer で全量を1ml とする
激しく攪拌（65℃、20min）
↓ CIA（クロロホルム：イソアミルアルコール＝24:1）で精製
イソプロパノール沈殿
▼ 70%エタノール洗浄
試料ＤＮＡ

図1205-1　小麦粉および麺からの DNA 抽出法（簡易 CTAB 法）

表1205-1　小麦加工品からの DNA 抽出量および純度

小麦加工品（試料重0.1g）	①市販 Kit*1 DNA 量（μg：試料 0.1g 当り）	①市販 Kit*1 $OD_{260/280}$	②簡易 CTAB 法 DNA 量（μg：試料 0.1g 当り）	②簡易 CTAB 法 $OD_{260/280}$
小麦粉	16.6	1.84	64.4	1.89
生麺	12.2	1.85	11.0	1.60
茹で麺	2.0	1.97	4.5	1.62
乾麺	9.3	1.81	29.4	1.71
味付油揚麺	6.1	1.74	13.5	1.68
パイ*2	1.0	1.60	9.7	1.44

*1：DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN）
*2：パイは糖・脂肪含量が高いため、試料を前処理（①CIA処理　②Boiling）して抽出に用いた。

注１：①②共に酵素処理（α-Amylase 10min→ ProteinaseK 20min：65℃）を併用した。
注２：数値は３反復の平均値

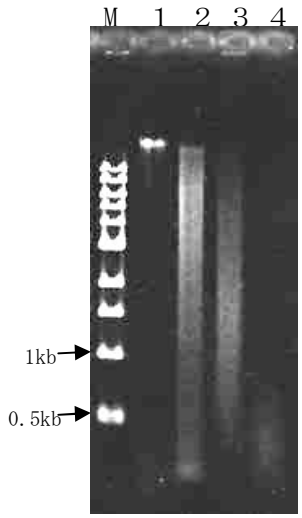


写真1205-7　各種小麦加工品における DNA の断片化

M：1Kb Ladder Marker
1:小麦粉、 2:生麺
3:茹で麺、 4:パイ

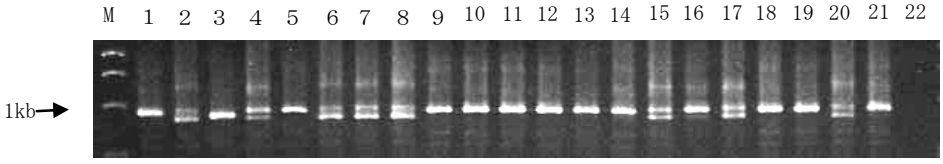


写真1205-8　LMW-GS(Glu-A3)遺伝子型に基づく PCR 法による小麦品種判別

M：1Kb Ladder Marker
（1～12:小麦粉）
1:さぬきの夢2000（SY）　2:ﾁｸｺﾞｲｽﾞﾐ　3:ﾎｸｼﾝ　4:ASW　5:Arrino
6:Calingiri　7:農林61号　8:ｼﾛｶﾞﾈｺﾑｷﾞ
9:ﾆｼﾉｶｵﾘ　10:ｲﾜｲﾉﾀﾞｲﾁ　11:ｷﾇｲﾛﾊ　12:ｷﾇﾋﾒ
（13～22：市販麺製品）
13:SY 100%茹で麺　14:市販半生麺（SY100%使用表示）
15:市販茹で麺（SY 使用表示）16:市販茹で冷凍麺（SY 使用表示）
17:市販味付け油揚げ麺　18:SY100%生麺（打ち粉 ASW）
19: SY100%茹で麺（打ち粉 ASW）20:市販半生麺（SY 使用表示）
21:市販そうめん（SY 使用表示）22:パイ（讃岐の地粉使用表示）

エ　考　察

(ｱ) グルテニンタンパクによる品種判別

SDS-PAGE による品種判別については、小麦粉だけでなく多くの加工品において可能であった。生麺、乾麺などの麺類やルウにおいては小麦粉とほとんど変わりなく判別することが可能であった。一方、これらに比べてより高温で加工するサブレや発酵過程を経る醤油については、タンパク質が変性したと考えられ、サブユニットの泳動パターンを利用した判別が困難であった。これらについては、他の手法により対応する必要がある。

また、市販キットを用いた方法についても検討を行った。従来の SDS-PAGE 法に比べてやや感度は劣るものの、同様な結果が得られたことから、分析技術の簡素化、平準化を図る観点からは有効であると考える。

(ｲ) DNA マーカーによる品種判別

小麦粉及び小麦加工品にはでんぷんやタンパク質等が多く含まれ、DNA の抽出効率が低下することが予想されたため、α-アミラーゼ、プロティナーゼＫによる酵素処理を併用した。その結果、純度の高い DNA を比較的短時間で抽出することができるようになった。特に市販のキットを用いた抽出条件が明らかになったことにより DNA 抽出の簡素化と再現性の向上が期待できる。

小麦加工品の製造工程における熱処理により DNA の断片化が確認された。小麦加工品は、麺をはじめ菓子、パンさらには味噌・醤油などきわめて多く、その加工過程も多岐にわたっている。DNA マーカーによる品種判別の対象をこれらにも拡大していくためには、より短い DNA 領域を増幅でき、また品種を個別に判別できるマーカーの作成が必要と思われる。

オ　今後の課題

(ｱ) グルテニンタンパクによる品種判別法については、17年度までに市販キット（F・システム）を用いたマニュアルを試作した。18年度以降に分析の妥当性を確認する予定であったが、当該キットの製造・販売が中止となったため、後継製品を用いた方法について検討を加え、品種判別法の実用化を図る。

(ｲ) DNA マーカーによる品種判別法については、(独)近畿中国四国農業研究センターの開発したマーカー等を用い、小麦粉及び小麦加工品における品種判別法の検証を行う。

カ　要　約

(ｱ) グルテニンタンパクによる品種判別

SDS-PAGE により、小麦タンパク質の一つであるグルテニンのサブユニットを分離し、そのバンドパターンの違いを比較した。その結果、国内で麺用に流通する主要品種を判別することが可能となった。この手法は、小麦粉に限らず、麺をはじめとする種々の小麦加工品についても適用が可能であった。

市販のタンパク質分析キットを用いた場合にも、やや感度は劣るものの同様の結果が得られたため、品種判別マニュアルを試作した。

(ｲ) DNA マーカーによる品種判別

従来の CTAB 法に酵素処理を組み合わせる方法及び市販の DNA 抽出キットを用いる方法により、純度の高い DNA を比較的短時間で抽出することができた。

製造工程において熱処理された小麦加工品では、DNA の断片化が確認された。

*Glu - A3*遺伝子の型を検出するプライマーを用いることにより、市販の麺製品について、「さぬきの夢2000」への異品種の混入が検出できた。

キ　引用文献

Ｆ・システム取扱説明書．アトー株式会社

本田雄一・太田尊士・三木哲弘・多田伸司 2002. 小麦新品種「さぬきの夢2000」の育成. 香川県農業試験場研究報告. 55:1-8.

池田達哉・矢野博 2003．小麦低分子グルテニン遺伝子型の簡易判別法．平成14年度近畿中国四国農業研究成果情報．59-60.

池田達哉・矢野博 2005．小麦における低分子量グルテニン・サブユニット遺伝子型の分類．平成16年度近畿中国四国農業研究成果情報．49-50.

研究担当者（十鳥秀樹*、村上恭子、村上てるみ、藤田究、三木哲弘、多田伸司）

6　大麦・裸麦加工製品における品種判別の検証

ア　研究目的

大麦・裸麦は味噌、焼酎、麦茶、ビール、麦飯といった様々な食品に加工される。消費者志向として国内産、地場産が好まれる傾向にあり、他の商品との差別化を図り、付加価値をつけるために「国内産大麦使用」と表示する商品がある。消費者の安全性、信頼性を確保する点から国内産大麦・裸麦品種と外

国産麦との判別が必要である。大麦・裸麦の加工品には味噌のように原料に大豆や微生物が使われるため製造過程で判別に用いるタンパク質や核酸に大麦・裸麦以外に由来するものが混入している可能性があること、麦茶のように原料を焙煎するためにタンパク質や核酸が分解している可能性もあること、短時間に多数の多型を解析する必要があることから、PCR を基本とした数100bp 以下の増幅産物が得られる遺伝子マーカーの開発を行う。

イ　研究方法

(ｱ) CAPS マーカーの開発

2 次元電気泳動法（IEF x SDS-PAGE）を用いて、種子貯蔵タンパク質の発現の詳細な解析を行い、品種間差異を明らかにした。また多型を示すタンパク質のアミノ酸配列およびDNA 塩基配列を決定し、品種間の1塩基多型を利用してCAPS マーカー化した。

(ｲ) SSR マーカーによる判別

公開されている SSR マーカーを用いて品種間の多型の有無をスクリーニングした。特に加工品の品種判別に有効と考えられた短いDNA 断片(150bp 以下)のPCR 増幅産物が得られるマーカーを中心に行った。多型の出現したマーカーを用いて加工品由来の DNA で PCR 増幅が可能かを検証した。

ウ　研究結果

(ｱ) CAPS マーカーの開発

2 次元泳動法を用いて種子貯蔵タンパク質を解析し、現在の裸麦主要品種である、「イチバンボシ」と「マンネンボシ」間で差異のあるスポットを見いだし(図1206-1)、データベースを基に両品種の遺伝子配列を決定した。この情報により両品種間での1塩基多型が見つかり、これをマーカー化した (図1206-2)。裸麦の主要な加工品である麦味噌から抽出した核酸を用いて、上記のマーカーを適用可能であることを確認した。

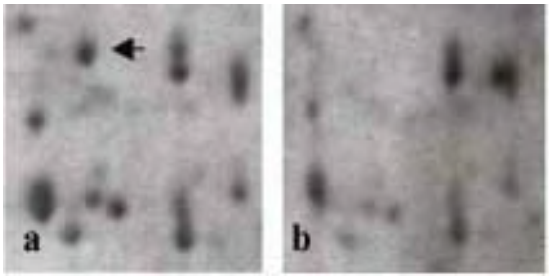


図1206-1　裸麦品種の種子貯蔵タンパク質の2次元泳動像の比較（pH5付近：分子量 1万-2万）a:イチバンボシ、b:マンネンボシ。矢印:イチバンボシで発現しているが、マンネンボシでは発現していないスポット。

図1206-2　CAPS マーカーを用いた品種判別
a:イチバンボシ　b:マンネンボシ
c:トヨノカゼ　d:四国裸84号
e:ニシノチカラ　f:サヌキハダカ
g:カシマムギ　h:ファイバースノウ
i:ミノリムギ　j:ヒノデハダカ
k:シュンライ　l:御島裸
m:あまぎ二条　n:四国裸102号
o:四国裸103号

(ｲ) SSR マーカーによる判別

対象となる加工品は粉、押し麦、味噌、麦茶とした。DNA 抽出は QIAGEN 社の DNeasy Plant Kit を用いた。焙煎程度の高い麦茶以外では100bp 程度の PCR 増幅産物は得られた。増幅産物が150bp 以下で、3 %アガロースゲルで分子量の差が明瞭に判別できるマーカーを葉由来のDNA を用いてスクリーニングした。多型の出現した数種類のマーカーを示す（表1206-1)。これらのマーカーを加工品由来から抽出したDNA に適用した。この結果いくつかのマーカーが利用可能であることを確認した(図1206-3)。

Bmag0131	Bmag0579	EBmac0701○
Bmag0173○	Bmag0807	EBmatc0003
Bmag0222○	Bmag0870	Bmatc0016
Bmag0223○	EBmac0679○	EBmag0781○
Bmag0337○	EBmac0518	HVPLASCIB○
Bmag0350	EBmac0635○	AF043094A
Bmag0353○	EBmac0674	HVLAAT

表1206-1　裸麦品種間で多型の出現したSSR マーカー　○印は裸麦品種「イチバンボシ」と「マンネンボシ」での判別が可能であったマーカー

図1206-3 Bmag0337を用いた判別例
1:イチバンボシ（葉）2:マンネンボシ（葉）
3:マンネンボシ（粉）4: マンネンボシ（押し麦）
5:イチバンボシ（押し麦）
M:分子量マーカー　(100bp)

エ　考察

本研究で利用したマーカーの中で、CAPS マーカーは PCR 増幅した後、必要に応じて精製し、制限酵素処理をする必要があるため、簡便で迅速に品種判別を行うためには SSR マーカーを利用した方が良いと考えられる。しかしその一方で、混入率を推定することを考えた場合には定量的 PCR が有用で、CAPS マーカーが利用価値が高い。使う試料に応じて適切な判別マーカーを利用するためには、複数の種類のマーカーを開発する必要がある。

オ　今後の課題

得られたマーカーを用いて加工品ごとに品種判別の検証をより詳細に行う必要がある。また味噌であれば発酵過程、押し麦であれば蒸気加熱過程、麦茶であれば穀粒の焙煎過程を経るために DNA の断片化等が避けられない。したがって断片化の進んでいる試料からの DNA 抽出の検討や、細胞あたりのコピー数の多い DNA を用いるといった手法を開発する必要がある。

カ　要約

タンパク質の品種間の発現の差から得られた CAPS マーカーを開発した。また数種類の SSR マーカーを用いて大麦・裸麦由来の加工品の品種判別が可能と考えられる DNA マーカーを開発した。

キ　引用文献

1)　大麦加工品に適用可能な CAPS マーカーの開発
柳澤貴司・池田達哉・高山敏之　2005
育種学研究 7(別1,2):465

研究担当者（柳澤貴司*）

7　大麦･裸麦加工製品における品種判別技術のマニュアル化と実証

ア　研究目的

大麦・裸麦加工製品の麦茶、味噌や押し麦の原料に占める外国産大麦の割合はそれぞれ50、25及び5％と多いものでは半数を占めている。近年の消費者の安心安全志向に応えるため、日常食品の大麦・裸麦加工製品の原材料について、国内産と外国産麦との判別技術や国内産麦の品種判別技術を開発する。特に、大麦・裸麦加工製品は微生物による発酵や加熱処理により核酸が分解している可能性が高いため、核酸の抽出や検出に有効な技術が必要と考えられる。そこで、開発した品種判別技術を一般に広く利用できるよう技術の平準化によるマニュアル化を図るとともに、判別法の有効性の実証を行う。

イ　研究方法

(ｱ) DNA 抽出キットの検討

市販されている10種類の DNA 抽出キット(表1207-1)を用いて大麦・裸麦加工製品の味噌、麦茶、押麦及び米粒麦(表1207-2)から DNA を抽出後、DNA の断片化消失の程度や濃度を測定した。

表1207-1 供試した DNA 抽出キットと特徴

製品名	メーカー	変性剤	精製方法	有機溶剤の使用	遠心の有無	所要時間(分)	回収最小断片(bp)
DNeasy Plant Mini Kit	QIAGEN	SDS	シリカメンブレン	×	○	60	＞200
MasterAmp Plant Leaf DNA Purification	AR BROWN	SDS	エタノール沈殿	×	○	60	－
reCTAB-S-mini	GSL	CTAB	シリカマトリックス	○	○	120	＞100
ISOFECAL	Nippon Gene	界面活性剤	エタノール沈殿	○	○	130	＞100
ISOPLANT	Nippon Gene	塩化ベンジル	エタノール沈殿	×	○	70	＞100
ISOGEN	Nippon Gene	グアニジン	エタノール沈殿	○	○	60	＞100
DNA Extraction Kit for GMO Detectio Ver.2	TAKARA	グアニジン	シリカメンブレン	×	○	60	－
Nucleon Phytopure	Amersham	SDS	イソプロパノール沈殿	○	○	90	＞100
Amp DNA Stool Mini Kit	QIAGEN	グアニジン	シリカメンブレン	×	○	60	＞200
PureLink Plant Total DNA Purerification Kit	Invitrogen	SDS	イオン交換樹脂	×	○	60	－

表1207-2　供試した大麦・裸麦加工製品と加工工程

製品名	原料品種	加工工程
味噌	イチバンボシ	精麦→浸水(30分)→蒸らし(120℃/30分)→発酵(40時間)→熟成(3か月)
麦茶１	イチバンボシ	浸水(2時間)→蒸らし(120℃/30分)→焙煎(180℃/20分)
麦茶２	イチバンボシ	浸水(12時間)→蒸らし(130℃/50分)→焙煎(550-350-250℃/30分)
はったい粉	イチバンボシ	浸水(2時間)→焙煎(180℃/5分)→粉砕
押麦１	イチバンボシ	精麦→浸水(2時間)→蒸らし(200℃/25分)→圧扁
押麦２	マンネンボシ	精麦→浸水(2時間)→蒸らし(200℃/25分)→圧扁
米粒麦１	イチバンボシ	精麦
米粒麦２	マンネンボシ	精麦
原麦	イチバンボシ	－
原麦	マンネンボシ	－

(ｲ) 大麦由来DNAの検出

大麦・裸麦加工製品から抽出した DNA は断片化や消失が予想されるため、大麦由来のDNAがPCR装置で増幅できる断片長を明らかにした。プライマーは130bp を増幅する CAPS マーカー(柳澤ら 2005)と公開されている215bpを増幅する大麦SSRマーカーを供試した。

ウ　研究結果

(ｱ) DNA抽出キットの検討

市販されている10種類のDNA抽出キットを用いて、大麦加工製品と原麦の6品目10種類からDNAを抽出した。大麦加工製品からのDNAの抽出の難度は、麦茶＞はったい粉＞味噌＞押麦＞米粒麦＞原麦の順に高く、米粒麦と押麦では原麦と同様に数 kbp の大きいサイズのDNAが抽出できた。味噌、麦茶及びはったい粉では、何れの抽出キットでも電気泳動上で大きいサイズのDNAのバンドは確認できなかった（図1207-1）。

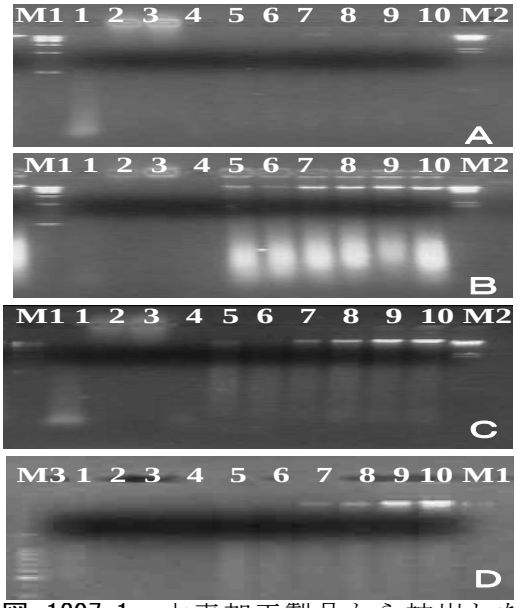


図 1207-1　大麦加工製品から抽出したDNAの電気泳動像

DNA 抽出キット　A:MasterPure PlantLeaf DNA Purification Kit, B:ISO-FECAL, C:Nucleon Phytopure, D:PureLink Plant Total DNA Purification Kit
材料 1:味噌, 2-3:麦茶, 4:はったい粉, 5-6:押麦, 7-8:米粒麦, 9-10:原麦
DNA Marker　M1:1kbp ladders, M2:λ/HindⅢ, M3:100bp ladders
電気泳動条件:Agarose S 2% TBE　100V 10μℓアプライ

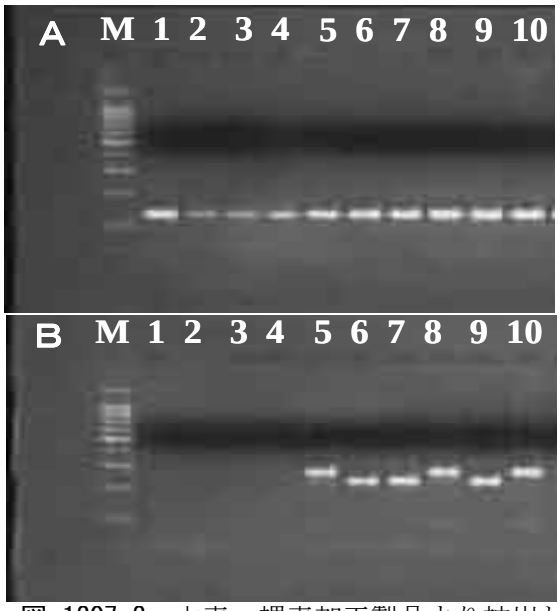


図 1207-2　大麦・裸麦加工製品より抽出したDNAのPCR産物の電気泳動像

DNA 抽出キット: PureLink Plant Total DNA Purification Kit
材料 1:味噌, 2-3:麦茶, 4:はったい粉, 5-6:押麦, 7-8:米粒麦, 9-10:原麦
PCR プライマー
A:CAPS マーカー(増幅断片 130bp)
B:大麦 SSR マーカー(増幅断片 215bp)
DNA Marker　M:100bp ladders
電気泳動条件 Agarose 21 2% TBE 100V 6μℓアプライ

味噌では蛍光分光光度計でのDNA濃度が押し麦と同程度に高いサンプルでも、バンドが確認できなかったことから、DNA の分解により断片化が進んでいると考えられた。また、麦茶とはったい粉ではDNA濃度がほとんどのキットで0で、DNA の電気泳動像でもバンドが無かったことから、焙煎処理によりDNA の相当な断片化、分解ないし消失の可能性が考えられた（表1207-3、図1207-1）。

(ｲ) 大麦由来DNA の検出

2種類のプライマーを用い、抽出したサンプルから大麦由来の DNA を PCR で増幅した。PureLink Plant Total DNA Purification Kit で抽出したサンプルでは、130bp を増幅する CAPS プライマー(柳澤ら 2005)は全ての加工製品から DNA 断片を増幅したが、215bp の SSR プライマーは押麦、米粒麦及び原麦からのみ増幅した（図1207-2）。したがって DNA の分解や消失が進んでいると考えられる加工製品からの PCR による検出には、イオン交換方式のキットで DNA を抽出し、100bp 前後の領域をターゲットとする必要があることがわかった。他のキットで抽出した味噌、麦茶及びはったい粉のサンプルからは、安定して DNA は増幅しなかった。

表1207-3　大麦・裸麦加工製品から抽出した DNA 濃度（蛍光分光光度計：ng/μL）

抽出キット	味噌	麦茶		はったい粉	押し麦		米粒麦		原麦	
		1	2		1	2	1	2	1	2
①	3.8	0.0	0.0	0.1	1.5	1.3	4.0	3.8	3.1	5.7
②	6.3	0.9	0.5	0.3	3.1	3.6	2.4	2.4	3.2	2.2
③	3.2	0.0	0.1	0.1	2.4	1.2	1.9	2.6	4.1	4.7
④	4.8	0.0	0.0	0.2	7.0	4.5	5.0	6.7	8.0	8.4
⑤	6.5	2.6	1.1	1.2	4.1	3.3	3.8	4.0	4.9	5.2
⑥	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
⑦	3.5	0.0	0.0	0.2	9.9	6.8	7.8	8.4	10.9	9.5
⑧	0.4	0.0	0.2	0.2	2.2	0.5	2.1	3.2	7.7	7.6
⑨	6.6	0.0	0.0	0.0	4.6	3.4	6.1	6.3	6.5	6.0
⑩	1.8	0.0	0.0	0.0	2.2	0.9	1.7	3.8	4.9	6.8

1 DNA抽出キット ①:DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN),②:MasterPure Plant Leaf DNA Purification Kit(AR BROWN),③: reCTAB-S mini(GSL),④:ISOFECAL(NIPPON GENE),⑤:ISOPLANT (NIPPON GENE),⑥:ISOGEN(NIPPON GENE),⑦:DNA Extraction Kit for GMO Detec-tionVer.2 (TAKARA),⑧:Nucleon Phytopure(AMERSHAM),⑨:QIAamp DNA Stool Mini Kit(QIAGEN),⑩:PureLink Plant Total DNA Purerification Kit(INVITROGEN)

2 DNAの抽出：各材料をミキサーで粉砕後、味噌は100mgほかは20mgの試料から、キットに添付の標準プロトコールで３回反復で行った。抽出したDNAは100μℓの滅菌水で溶解した。

3 DNAの濃度測定:NanoDrop社のND-3300 Fluorospectrometer(Hoechst Dye 33258)で行った。自家蛍光を補正済みの値である。

エ　考察

大麦・裸麦加工製品のうち押麦や米粒麦からは比較的DNA の抽出と検出が比較的容易であるが、味噌、麦茶及びはったい粉は困難で、発酵や焙煎の加工処理によりDNA の断片化や消失が進んでいると考えられる。イオン交換方式の抽出キットは味噌や麦茶でも、大麦由来の DNA が検出できたことから、加工製品からの DNA 抽出に適すると考えられる(岡本ら 2006)。

オ　今後の課題

大麦・裸麦の品種判別用マーカーが大麦・裸麦の加工製品、特に DNA の断片化や消失が進んでいる味噌や麦茶で適用可能かを検討する。また、品種判別法のマニュアル化のため、技術の平準化を図る必要がある。

カ　要約

大麦・裸麦加工製品の味噌、麦茶、はったい粉、押麦、米粒麦ではイオン交換樹脂式のキットで DNA

を抽出することにより、約100bp の DNA 領域を増幅することができた。

キ　引用文献

岡本ら 2006. 裸麦加工食品からの DNA の抽出と PCR による多型の検出. 育種学研究. 8（別 2）

柳澤ら　2005. 大麦加工品に適用可能な CAPS マーカーの開発. 育種学研究. 7（別 1，2）：465

研究担当者（清水国広・栗坂信之*・岡本充智）

8　アズキにおける SSR マーカーの開発

ア　研究目的

近年低価格の海外産マメ類の輸入が増加しているだけでなく、海外に流出した北海道の優良なアズキ育成品種が海外品種に混ざって輸入されている。このような輸入品に対し品種育成者権の侵害を立証するには、原材料の由来が特定できるような品種識別技術が必要となる。しかしながら、輸入農産物や加工製品には海外遺伝資源が含まれるだけでなく、DNA の断片化が著しい加工製品からの遺伝子増幅も困難なため、従来の方法よりも高度な品種識別技術が必要とされる。そこで、本課題では断片化した DNA においても遺伝子が増幅可能な SSR（Simple Sequence Repeat）マーカーを用いて、海外遺伝資源を網羅した高精度の小豆品種識別方法を確立する。さらに、課題「豆類加工製品における品種判別の検証」（北海道立中央農試）と連携して、民間レベルで実施可能な品種識別手法を開発する。

イ　研究方法

(ｱ) 優良育成品種識別マーカーの検索と品種識別精度の検討

蛍光キャピラリーシークエンサーを用いて北海道育成の優良品種「エリモショウズ」,「きたのおとめ」,「しゅまり」が識別可能な SSR マーカーを検索した。SSR マーカーは Wang ら(2004)が開発したものを使用した。国内主要育成品種 8 点、中国在来種81点、韓国在来種118点、台湾在来種40点より優良育成品種識別マーカーに関する対立遺伝子情報を収集し、品種識別精度を算定した。

(ｲ) 簡易品種識別方法の検討

SSR マーカーの組み合わせの選定、アクリルアミドゲル電気泳動、マルチプレックス PCR の条件等効率よく品種識別が可能な手法を検討し、輸入小豆7銘柄の種子を検定した。

(ｳ) 加工品での品種識別方法の検討

品種識別が可能な SSR マーカーと蛍光キャピラリーシークエンサーを用いて、北海道立中央農試から提供された 7 種類の加糖餡 DNA の解析を試みた。

ウ　研究結果

(ｱ) 優良育成品種識別マーカーの検索と品種識別精度の検討

蛍光キャピラリーシークエンサーを用いて小豆の主要8品種と海外産小豆在来種239点のフラグメント解析を行い、「きたのおとめ」および「しゅまり」と海外の在来種との識別に利用できる SSR プライマー対 5 種類を選抜した。1マーカーでは「しゅまり」や「きたのおとめ」と同じような増幅 DNA 断片長をもつ海外小豆在来種が認められたが（図1208-1）、5 種類のマーカーで総合的に判定すると、輸入検査品の遺伝子型が偶然に「しゅまり」や「きたのおとめ」と一致する確率は低く、品種の識別が可能であった（表1208-1）。

表1208-1　輸入検査品が「きたのおとめ」および「しゅまり」と一致する確率

*:海外遺伝資源における「きたのおとめ」と「しゅまり」の対立遺伝子頻度を示す

輸入品の検査対象	マーカー数	遺伝子型が偶然一致する確率	識別に用いるマーカー*				
			CEDG029	CEDG008	CEDG015	CEDG024	CEDG007
きたのおとめ	3	0.205	0.12	0.12	0.07		
しゅまり	3	0.020	0.07	0.02	0.07		
きたのおとめ	4	0.081	0.12	0.12	0.07	0.37	
しゅまり	4	0.007	0.07	0.02	0.07	0.37	
きたのおとめ	5	0.025	0.12	0.12	0.07	0.37	0.29
しゅまり	5	0.002	0.07	0.02	0.07	0.37	0.29

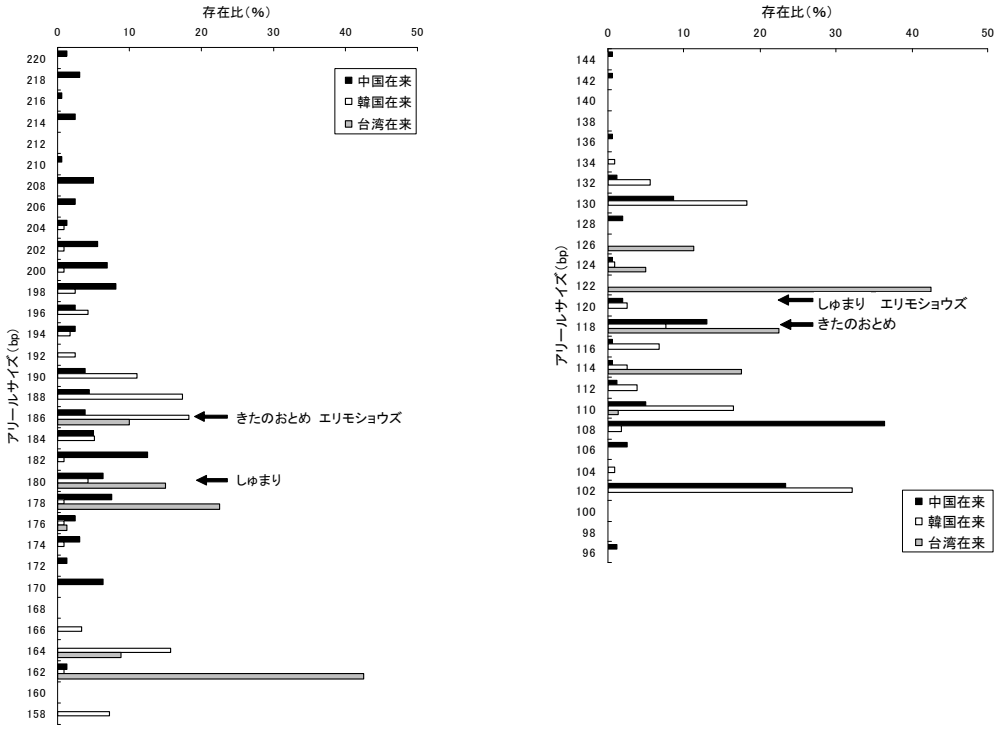


図1208-1 シークエンサーで検出された海外の小豆在来種239点（中国81、韓国118、台湾40点）と北海道優良育成3品種のアリールサイズと頻度分布（左）CEDG029、(右)CEDG008

(ｲ) 簡易品種識別方法の検討

品種識別の効率化を図るために、複数のプライマー対を混合するマルチプレックス PCR を考案し、2 種類のマルチプレックス PCR 産物をアクリルアミドゲル電気泳動することで品種が識別できる条件を決定した（図1208-2）。さらに、輸入小豆 7 銘柄について、それぞれ数粒の種子を検定したところ、1 銘柄のなかに異なるアリールをもった種子が見つかり、輸入小豆は非常に雑多であることがわかった。なお、これらのなかには登録品種「きたのおとめ」、「しゅまり」と同じ遺伝子型を示す小豆は認められなかった。

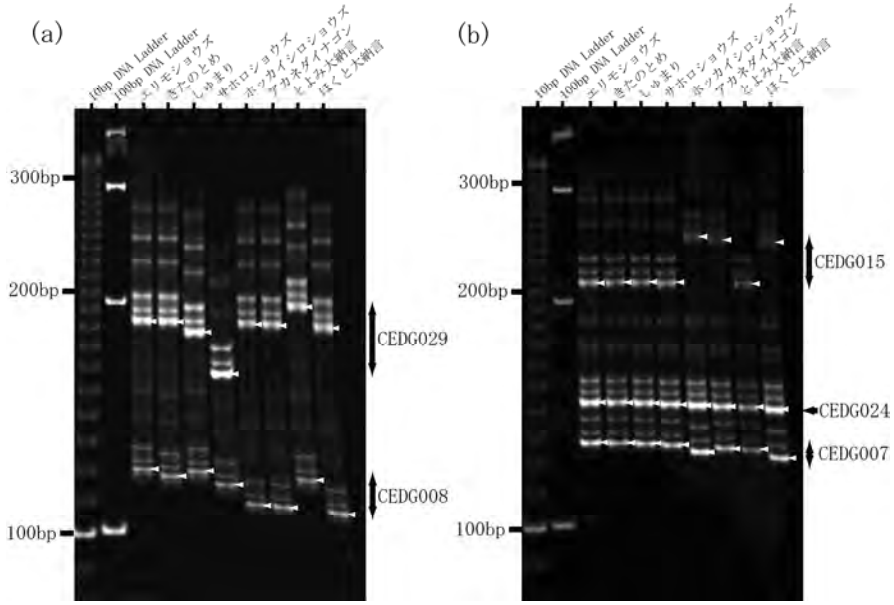


図1208-2 マルチプレックス PCR 産物のアクリルアミド電気泳動像 (a)CEDG029および CEDG008のマルチプレックス、(b)CEDG015、CEDG024および CEDG007のマルチプレックス

(ｳ) 加工品での品種識別方法の検討

加糖餡では複数の品種が混合されていることも考えられるので、一種類の蛍光化 SSR プライマーを用いた PCR を行い、蛍光キャピラリーシーケンサーによる加糖餡の品種識別を試みた。加工製品では DNA の断片化が著しいと予想されたが、全ての提供サンプルから SSR マーカーを増幅することができた。国産加糖餡２点、中国産加糖餡5点を検定した結果、国産加糖餡Ａは「エリモショウズ」と「きたのおとめ」の混合品、国産加糖餡Ｂは銘柄のとおり「しゅまり」であった(表1208-2)。日本品種を原料とした国産加糖餡は遺伝子型が均一で原材料が特定できたのに対し、中国産加糖餡では複数のアリールが検出され、原材料を特定することは困難であるが、国産と中国産との判別は可能と思われる。また、今回検定した中国産加糖餡には、北海道の登録品種「きたのおとめ」や「しゅまり」が混入したものは認められなかった。ただし、中国産加糖餡の識別に最も有効であった SSR マーカーCEDG008がなければ、中国加糖餡Ａ，Ｃ及びＥは「きたのおとめ」と全マーカーでアリールが一致し(表1208-2)、「きたのおとめが含まれる」という結果になった可能性がある。このように加工品では複数の品種が混在する可能性があるので、今後日本品種特異的なマーカーの開発やマーカー数の増加などによって識別精度を向上させる必要がある。

表1208-2　中国産及び国産加糖餡の検定結果(数値はシークエンサーで測定された bp 値)

	中国産加糖餡					国内産加糖餡				
マーカー	A	B	C	D	E	A	B	きたのおとめ	エリモショウズ	しゅまり
CEDG029	186	176	186	176	186	186	180	186	186	180
		178		178	188					
		180		180						
		182		182						
CEDG008	86	94	102	108	102	118	120	118	120	120
	110	102	110		110	120				
		108								
		110								
CEDG015	212	212	212	198	208	212	212	212	212	212
	218		216	206	210					
	247		247	216	212					
					218					
					247					
CEDG024	129	129	113	131	129	141	141	141	141	141
	139		129	133	133					
	141		133		141					
			141							
CEDG007	128	126	128	128	128	130	130	130	130	130
	130	130	130	130	130					

エ　考　察

(ア) 優良育成品種識別マーカーの利用

本課題では、アクリルアミドゲル電気泳動によって優良育成品種を簡易的に識別する方法を開発したが、より確実に品種を識別するには、シークエンサーによるフラグメント解析が有効である。シークエンサーではPCR産物と内部標準を同時に電気泳動するので、DNA断片長の測定が可能である。このような手法は他のキャピラリー電気泳動装置でも可能になってきている。また、シークエンサーを用いた解析では、あらかじめ蛍光標識したプライマーを用いてPCRを行い、蛍光プライマーが取り込まれたPCR産物はシークエンサーによる電気泳動中にリアルタイムで検出され、1サンプルに含まれている複数の蛍光色素を同時に検出できるので、複数の蛍光プライマーを混ぜ合わせたマルチプレックスPCR 1反応分を1回電気泳動するだけで、全マーカーに関するデータが一度に得られるのが特徴である。注意点としては、シークエンサーから得られるマーカーのアリールサイズはポリアクリルアミドゲルの結果と若干異なることである。図1208-1及び表1208-2のbp値は、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzerで測定されたLIZ Size standardに対する相対値の小数点以下を四捨五入した値である。この値は解析機器や電気泳動条件等によって若干変動するので、絶対値ではないことに留意しなければならない。品種を判定する場合には、必ず検査品と対象品種の増幅DNA産物を同時に電気泳動し、アリールサイズが一致するかどうかの確認が必要である。

なお、本課題で決定した詳細な解析条件は、農林水産省生産局種苗課「品種登録ホームページ」の植物のDNA品種識別についての基本的な留意事項参考資料5「DNA分析による小豆品種の識別について」、参考資料6「DNA分析による小豆のあん品種の識別について」で公開している。

(イ) 加工品での品種識別

国産加糖餡のように遺伝子型が比較的均一な加工品の場合は、蛍光シークエンサーによる品種識別が可能であったが、中国小豆のように原料の遺伝子型が非常に雑多な場合は、蛍光シークエンサーを用いても原材料の特定は困難であった。その理由は共優性のSSRマーカーの特徴にある。SSRマーカーはほぼ全ての品種で増幅可能で、高度の多型性を有することから品種識別に適しているが、その反面、1試料中の品種数が増えるに伴ってアリール数も増加し、検査品が優良育成品種のアリールと偶然一致する確率も高まってしまう。またアリール数の増加によって、検出限界を下回るアリールも認められたので、そのような場合は混入した品種を特定できない。1試料中にどの程度の割合で国産優良品種が混合されているかを知るには、優良育成品種特異的なマーカーを開発し、加工品に含まれる優良育成品種の混入率を定量することが望ましい。

オ　今後の課題

加工品での品種識別

加工品では複数の品種の混在が認められたので、今後マーカー数の増加などによって識別精度を向上させるとともに、優良育成品種特異的なマーカーを開発し、加工品における優良育成品種の混入率を定量することが必要と思われる。

カ　要　約

小豆の主要品種と海外産小豆在来種を解析し、「きたのおとめ」および「しゅまり」の国産優良品種と海外の在来種との識別に利用できるSSRプライマー対5種類を選抜した。さらに品種識別の信頼性の向上と効率化を図るために、2種類のマルチプレックスPCR産物をアクリルアミドゲル電気泳動することで、国産優良品種が識別できる条件を決定した。さらに蛍光シークエンサーによる加工製品の品種識別を試みたところ、遺伝子型が非常に雑多な加工品では原材料の特定が困難であったが、国産加糖餡では原材料の特定が可能であった。

キ　引用文献

Wang ら　2004. The development of SSR markers by a new method in plants and their application to gene flow studies in azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi]. Theor Appl Genet 109: 352-360.

研究担当者（加賀秋人*、友岡憲彦、ダンカン・ヴォーン、伊勢村武久）

9　豆類加工製品における品種判別の検証

ア　研究目的

近年低価格な海外産豆類の輸入増加に伴い、国内育成優良品種の種苗が海外に流出し、生産物が逆輸

入される事例が認められる。農産物の適正な表示を担保し、種苗法に基づく育成者権を保護するためには、これら豆類の迅速で精度の高い品種判別法を確立する必要がある。さらに、冷凍ゆでアズキや加糖餡など、加工した形での豆類の輸入も急増しているため、加工製品における品種判別法の要望も強い。本課題では白インゲンマメ(手亡)及びアズキについて、既存の RAPD-STS マーカーの識別性を検証するとともに、新たに農業生物資源研究所で開発した識別性の高いアズキ SSR マーカーの利用について検討する。

イ　研究方法

(ｱ) RAPD-STS マーカーによる品種判別法の検証

白インゲンマメ（手亡）及びアズキの RAPD-STS マーカーについて、海外産の遺伝資源等を多数供試して、品種の識別性を検証する。

(ｲ) SSR マーカーによるアズキ及びアズキ加糖餡の品種判別

独立行政法人農業生物資源研究所が開発したアズキの SSR マーカーを用いて、輸入アズキ及びアズキ加糖餡の品種判別法を検討する。

ウ　研究結果

(ｱ) RAPD-STS マーカーによる品種判別法の検証

北海道立中央農業試験場が開発した白インゲンマメ（手亡）及びアズキの RAPD-STS マーカー（紙谷ら2004a、紙谷ら2004b）について輸入豆類、海外産遺伝資源等を多数供試して、RAPD-STS マーカーによる品種の識別性を検討した。北海道産白インゲンマメ 9 品種、海外遺伝資源100点及び輸入白インゲンマメ 3 点の合計112点について、白インゲンマメ（手亡）判別用マーカー 3 種を供試した結果、北海道の主要品種と輸入白インゲンマメの判別は明瞭であった(図1209-1)。また種苗登録品種の「雪手亡」と同じ増幅パターンを示す海外遺伝資源が 3 点認められたが(表1209-1)、これらの遺伝資源は百粒重が「雪手亡」の32.7g に対し17.2～20.2g といずれも粒大が明らかに小さく、種子の外観により「雪手亡」との判別は可能であった。

アズキでは北海道産27品種、国内外の遺伝資源59点、北海道立十勝農業試験場の育成系統10系統の合計96点について、アズキ判別用マーカー 3 種を供試した。その結果、登録品種の「きたのおとめ」と同じパターンを示すアズキが 8 点、「しゅまり」と同じパターンを示すアズキは20点認められた(表1209-2)。しかし、アズキの主要 3 品種と中国からの輸入アズキ10点を比較した結果、輸入アズキと登録品種の判別は可能であった(表1209-3)。

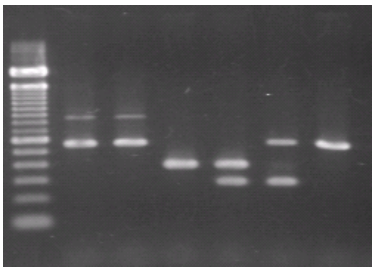


図1209-1　白インゲンマメの品種判別(SP01+SP02)

表1209-1　白インゲンマメの品種判別

SP01 290bp	SP02 390bp	SP02 560bp	SP02 800bp	SP03 450bp	北海道	海外	輸入	主な品種
+	+	−	−	+	1	3	0	雪手亡
+	+	−	−	−	0	1	0	
+	−	+	−	+	1	10	0	姫手亡
+	−	+	−	−	0	1	0	
−	+	+	−	−	0	1	0	
−	+	−	+	+	0	1	0	
−	+	−	−	+	0	18	0	
−	+	−	−	−	0	14	1	小白芸豆
−	−	+	+	+	0	5	1	ピービーン
−	−	+	+	−	0	1	1	ｸﾞﾚｰﾄﾉｰｻﾞﾝ
−	−	+	−	+	0	18	0	
−	−	+	−	−	4	19	0	銀手亡
−	−	−	−	+	3	8	0	福白金時
		合計			9	100	3	

表1209-2　RAPD-STS マーカーによるアズキの品種判別

SV01	SV02	SV03	北海道	府県	台湾	中国	韓国	育成系統	主な品種
+	+	+	2	3	2	2	0	0	きたのおとめ
+	+	−	2	0	0	1	3	0	
+	−	+	0	1	1	12	4	1	
+	−	−	4	0	0	4	12	0	ｱｶﾈﾀﾞｲﾅｺﾞﾝ
−	+	+	7	5	1	0	0	4	ｻﾎﾛｼｮｳｽﾞ
−	+	−	1	0	0	0	0	2	ｴﾘﾓｼｮｳｽﾞ
−	−	+	11	7	1	0	0	2	しゅまり
−	−	−	0	0	0	0	0	1	
合		計	27	16	5	19	19	10	

表1209-3　RAPD-STS マーカーによる輸入アズキの品種判別

品種・銘柄	SV01	SV02	SV03
エリモショウズ	−	+	−
きたのおとめ	+	+	+
しゅまり	−	−	+
東北小豆-1	+	−	+
東北小豆-2	+	−	−
天津小豆	+	−	+
宝清小豆-1	+	−	+
宝清小豆-2	+	−	−
河北小豆	+	−	+
山西小豆	+	−	+
延辺小豆-1	−	+	+
延辺小豆-2	+	−	+
陝西小豆	+	−	+

(ｲ) SSR マーカーによるアズキ及びアズキ加糖餡の品種判別

不特定の輸入豆類と国内の登録品種を識別するためには、少数の RAPD-STS マーカーでは識別性が十分ではない。また、アズキ加糖餡など加工製品では加熱により DNA が断片化されている。さらに、海外産豆類を原料とした加工製品では複数の遺伝子型が混在している可能性も高いため、より識別性の高いマーカーが必要となる。このため、独立行政法人農業生物資源研究所で開発されたアズキ SSR マーカー(wang ら2004)を用いて、アズキ及びアズキ加糖餡の品種判別を検討した。その結果、5 種の SSR マーカーを用いることで、国産アズキ主要品種の判別が可能であった(表1209-4)。同様に農業生物資源研究所で海外のアズキ遺伝資源239点(中国81、韓国118、台湾40)を検定したところ、登録品種「きたのおとめ」、「しゅまり」と同じ遺伝子型を示すものは認められなかった。また、輸入アズキについて同一銘柄内の複数の粒を検定した結果、多様な遺伝子型を示し、輸入アズキの銘柄は雑多な遺伝子型の混合集団であると考えられた(図1209-2)。

アズキ加糖餡について国産 3 点、中国産 5 点を供試した結果、国産加糖餡はそれぞれ「エリモショウズ」、「きたのおとめ」、「しゅまり」に遺伝子型が一致した(表1209-5)。中国産の加糖餡はこれらと遺伝子型が異なり、判別が可能であった。中国産の加糖餡では増幅断片の泳動像が必ずしも明瞭ではなく、遺伝子型の判定が困難な試料が認められた(図1209-3)。

表1209-4　アズキの品種判別

品種名	G029	G008	G015	G024	G007
ｴﾘﾓｼｮｳｽﾞ	185	120	206	144	128
きたのおとめ	185	118	206	144	128
しゅまり	179	120	206	144	128
ｻﾎﾛｼｮｳｽﾞ	157	116	206	144	128
ﾎｯｶｲｼﾛｼｮｳｽﾞ	185	110	244	144	126
ｱｶﾈﾀﾞｲﾅｺﾞﾝ	185	110	242	144	128
とよみ大納言	195	120	206	144	128
ほくと大納言	185	110	242	144	126

数字は目視による塩基対数(bp)

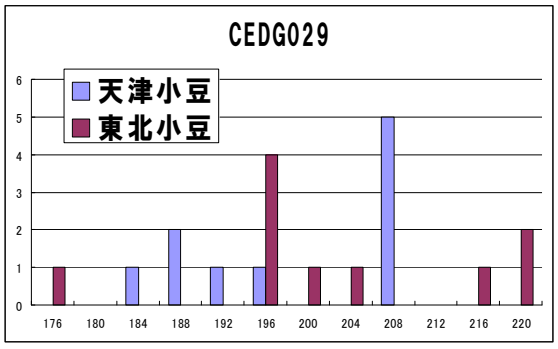


図1209-2　中国アズキ銘柄内の多型
（天津小豆、東北小豆）

表1209-5　SSR マーカーによる加糖餡の品種判別（目視による増幅断片の塩基対数）

加糖餡	G029	G008	G024	G015	G007	判　　定
1 国内産-1	185	120	144	206	128	エリモショウズ
2 国内産-2	185	118	144	206	128	きたのおとめ
3 国内産-3	179	120	144	206	128	しゅまり
4 中国産-1	185	70/100	144	204	128	
5 中国産-2	185	100	136/144	210	128	
6 中国産-3	179	90/100	130/144	170/204	128	
7 中国産-4	185	104	130/144	210	128	
8 中国産-5	179	104	136	206	128	

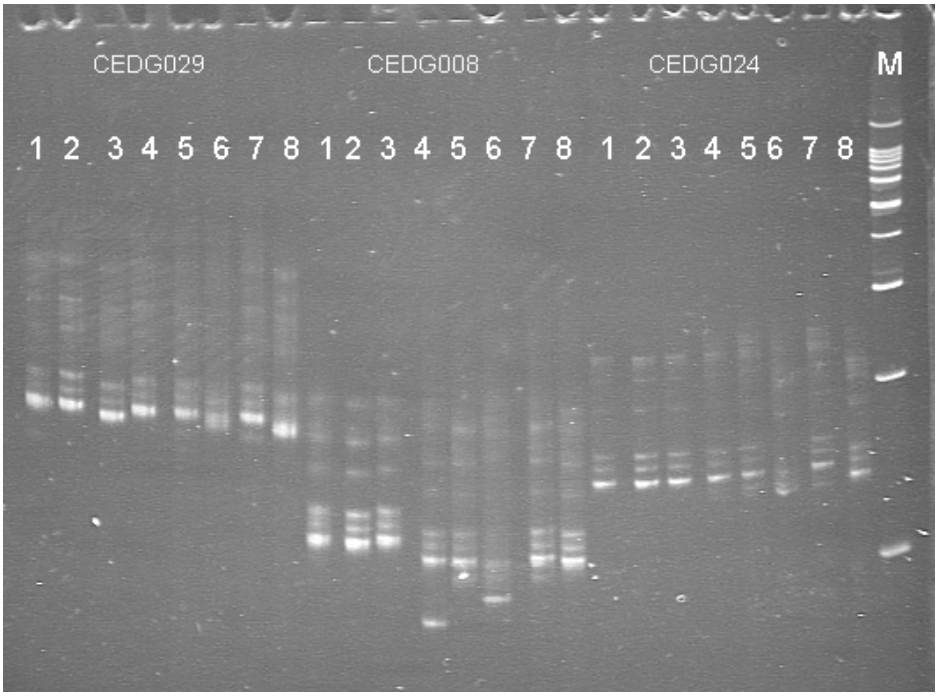


図1209-3　SSR マーカーによる増幅結果（数字は表1209-5に対応）

エ　考　察

(ｱ) RAPD-STS マーカーによる白インゲンマメ(手亡)の品種判別

インゲンマメは世界各地で生産され、日本は年間約 6 万 t を輸入している。インゲンマメの子実は、種皮の地色、斑紋の種類と色、環色、子実の大きさや形など品種により多様な特性を示すため、これらの特性により品種の大まかな区分が可能である。また、実際にも金時類や手亡類など子実の特性区分に基づき流通している場合が多い。北海道の白インゲンマメである手亡類は、子実の特性や大きさから金時や大福など他のインゲンマメとの区分は容易である。近年、海外でも手亡が生産され輸入が開始されたため、RAPD-STS マーカーによる手亡の登録品種「雪手亡」と輸入白インゲンマメとの品種判別法を検討した。その結果、主な輸入白インゲンマメと「雪手亡」の判別は明確で、多数の遺伝資源との比較においても子実の特性を考慮することで「雪手亡」の判別は可能であった。インゲンマメは子実の特性が多様なため、3 種の RAPD-STS マーカーでも子実の外観特性等を考慮することで手亡の品種判別が可能である。

(ｲ) RAPD-STS、SSR マーカーによるアズキ及びアズキ加糖餡の品種判別

アズキは中国、日本など東南アジアで栽培されてきたが、現在では北米やオーストラリア等にも新規作物として導入され、日本に輸出されている。日本のアズキ輸入量は年間約 3 万 t で、加糖餡などアズキ加工製品の輸入も急増している。新規導入の北米やオーストラリアでは、北海道の基幹品種「エリモショウズ」が普及し栽培されている。また、最近は中国

でも在来種に加え日本品種が栽培、輸出されているため、RAPD-STS マーカーによる輸入アズキの品種判別法を検討した。その結果、輸入アズキと主な登録品種の判別は可能であった。しかし、アズキは子実の外観による判別が困難なため、少数の RAPD-STS マーカーのみでは不特定の輸入アズキの判別には十分ではない。そのため、新たに農業生物資源研究所が開発した 5 種の SSR マーカーを検討した結果、識別性が高く品種判別が可能であった。また、SSR マーカーにより輸入アズキを検定した結果、中国アズキは同一銘柄内での遺伝子型変異が多く、雑多な混合集団と考えられた。

近年輸入が急増しているアズキ加糖餡の品種判別を検討した。加糖餡では DNA の断片化が予想されるため、識別性が高く信頼性に優る SSR マーカーを供試した。国産の加糖餡では SSR マーカーによる原料品種の推定が可能で、中国産加糖餡との判別も可能であった。しかし、中国アズキは遺伝子型が多様で、SSR マーカーでは一定の傾向を示さない。このため、中国産加糖餡では原料アズキの銘柄特定は難しく、また中国アズキに少量の日本品種が混入した場合にも検出は難しいと考えられる。今後、少量の日本品種の混入を検出するには、日本品種に特異的なマーカーを開発する必要がある。

RAPD-STS マーカーの検出はアガロースゲル電気泳動を使用した。SSR マーカーの検出はポリアクリルアミドゲル電気泳動で行ったが、分解能がやや劣るため精度の高い解析にはシークエンサーの利用が望ましい。また、本課題の成果は農林水産省生産局種苗課「品種登録ホームページ(http://www.hinsyu.maff.go.jp/)」にマニュアルとして公開した。

オ　今後の課題

(ア) インゲンマメ及び加工製品の品種判別

白インゲンマメ以外のインゲンマメ、特に輸入量の多い赤系インゲンマメ(金時類)の品種判別法の検討が残されている。また加工製品で、白餡は手亡以外にも大福やベニバナインゲンマメ、ライマメなど多様な材料で作られるため、これらの判別法も望まれている。

(イ) アズキ加工製品の品種判別

アズキ加糖餡の品種判別は可能となったが、中国アズキに少量の日本品種が混入した場合の検出は難しい。このため、日本品種に特異的なマーカーの開発が必要である。

カ　要　約

RAPD-STS マーカーによる品種判別法を検討した結果、白インゲンマメ(手亡)では輸入豆類と登録品種「雪手亡」の判別が可能であった。インゲンマメは子実の外観特性が多様なため、これらの特性も考慮して品種を判別する。アズキでは RAPD-STS マーカーにより、主な登録品種と輸入アズキの判別が可能であったが、SSR マーカーを用いることで品種判別の精度が向上する。また、中国アズキの銘柄は雑多な遺伝子型の混合集団であることが明らかとなった。アズキ加糖餡に関して、SSR マーカーにより国産加糖餡の品種判別が可能であった。中国産加糖餡では遺伝子型が雑多なため、国産品との違いは明瞭であったが、原料アズキの銘柄特定は困難であった。

キ　引用文献

紙谷ら　2004a. 豆類の品種判別. 特許公開公報. 特開2004-16008.

紙谷ら　2004b. DNA 多型による白インゲンマメ品種「雪手亡」の識別. 育種学研究. 6:29-32.

Wang ら　2004. The development of SSR markers by a new method in plants and their application to gene flow studies in azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi]. Theor Appl Genet 109: 352-360.

研究担当者　(紙谷元一*・竹内徹・田澤暁子・冨田謙一)

10　ネギの品種判別法の開発

ア　研究目的

産地や品種の偽装表示の防止および育成者権の保護のため、DNA マーカーによる品種識別技術が有効である。しかし、ネギは他殖性であることから、一つの品種のすべての個体が同一の遺伝子型で固定しているわけではない。そこで、ネギ品種内の DNA 多型程度を把握した上で、品種判別に有効な手法を開発する。

イ　研究方法

(ア) SSR マーカーによるネギ品種内 DNA 多型

ネギ（*Allium fistulosum*）市販 F_1 品種 6 、市販 OP 品種 1 、在来品種 1 および近縁野生種（*A. altaicum*）

1系統を用い、各品種・系統当たり33個体よりDNAを抽出した。これまでにネギ品種間において高い多型性が認められた14 SSR座を用いて、個体別にPCRを行い、個体ごとの遺伝子型を調査した。各座における対立遺伝子数、遺伝子型数、優占的な遺伝子型を示す個体の割合（Pr%）および多型遺伝子座の割合（Pl）により品種内多型程度を評価した。

(イ)「下仁田」を用いた「品種標識法」の実証

ネギ連鎖地図（塚崎ら，2004）に位置付けられたSSRマーカー17個を用いて「下仁田」37個体の品種内多型を調査した。各SSR座における品種内多型程度およびネギ連鎖地図上のSSR座の座乗位置から、品種標識に用いる2種類のマーカーグループ（A、B）を選定した。原品種の自殖後代について、各マーカーグループについて特定の遺伝子型ホモに固定した個体を26および40個体選抜し、それぞれ集団交配を行い「下仁田(A)、(B)」とした。SSR座について無選抜の原品種と同様に栽培し、一般形質について調査した。

ウ　研究結果

(ア) SSRマーカーによるネギ品種内DNA多型

各品種における対立遺伝子数は2から7であり、調査した全ての品種のほぼ全てのSSR座について高い品種内多型が存在した（表1210-1）。14座の平均Pr%は、F_1品種では比較的高くなる傾向であったものの、F_1品種の中には、Pr値が在来品種や近縁種と同程度の品種も存在した（表1210-1）。この結果から、既存品種において品種を特定する遺伝子型を決めることは不可能であろうと考えられる。そこで、品種内で高い品種内DNA多型を保持する作物において、品種同定を容易かつ正確に行うことを可能にする「品種標識法」を提案した（図1210-1）。

表1210-1　ネギおよび近縁種における14 SSR座の対立遺伝子数、遺伝子型数、優占的な遺伝子型を示す個体の割合（Pr%）および多型遺伝子座の割合（*Pl*）

植物種	品種	対立遺伝子数			遺伝子型数			Pr%	*Pl*
		最大	最小	平均	最大	最小	平均	平均	
ネギ	品種 1 (F_1)	4	2	2.7	6	2	3.4	63	100
Allium fistulosum	品種 2 (F_1)	5	2	3.1	7	2	4.5	56	100
	品種 3 (F_1)	4	2	2.9	5	1	3.4	70	86
	品種 4 (F_1)	4	2	2.9	5	1	3.2	73	86
	品種 5 (F_1)	6	2	3.3	7	2	3.4	56	100
	品種 6 (F_1)	4	2	3.1	5	2	4.1	49	100
	(F_1 6品種の平均)	4.5	2	3.0	5.8	1.7	3.7	61	95
	吉蔵（OP）	5	2	3.2	9	2	5.1	50	100
	尾島 (在来品種)	7	2	3.6	15	2	5.6	45	100
	(ネギ8品種の平均)	4.9	2	3.1	7.4	1.8	4.1	58	96
A. altaicum	JP138870	6	2	3.4	7	2	4.6	49	100
	平均	5.0	2	3.1	7.3	1.8	4.1	57	97

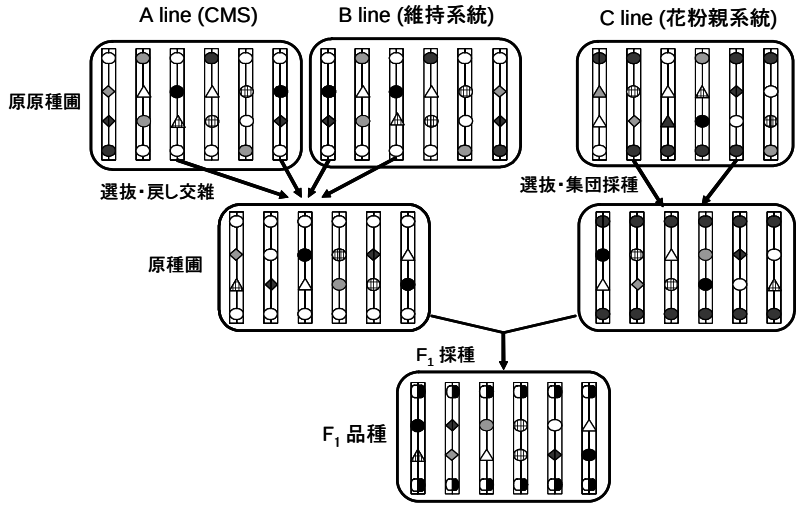


図1210-1　ネギF_1品種育成におけるSSRマーカーを用いた「品種標識法」

この場合、2座について種子親系統では白、花粉親系統では黒の遺伝子型ホモの個体を選抜して採種する（その他の遺伝子座については人為的に固定しない）。これらを両親としたF_1品種では、この2座の遺伝子型は白と黒のヘテロで完全に固定されており、これらの2座を調査することで、他品種との識別やF_1純度検定などが可能となる。

(イ) 「下仁田」を用いた「品種標識法」の実証

「下仁田」の品種内 DNA 多型程度を調査した結果、SSR 座によって Pr%が低いグループと高いグループが存在し、Pr%が低い SSR 座から 2 座、高いグループから 4 座選択した（表1210-2)。原品種の自殖後代からそれぞれ特定の遺伝子型ホモで固定した個体を選抜し、集団採種した 2 集団と原品種とを比較栽培した結果、一般形質について原品種との有意差は認められなかった（表1210-3)。

表1210-2 「下仁田」における品種内DNA多型

SSR座	連鎖群 a)	対立遺伝子数	PIC	最頻対立遺伝子頻度	遺伝子型数	Pr%	Marker group
AFS015	2	2	0.50	54.1	3	70	
AFS017	1	10	0.82	29.2	21	17	
AFS039	7	6	0.76	36.8	13	21	A
AFS088	1	3	0.57	58.3	6	39	A
AFS099	5	5	0.47	53.5	6	54	B
AFS103	5	6	0.73	38.7	13	34	
AFS131	8	3	0.48	59.5	5	46	B
AFS140	9	6	0.57	54.1	7	41	B
AFS142	2	3	0.45	61.4	5	54	B
平均		4.9	0.59	49.5	8.8	42	

a)：ネギ戻し交雑集団より作製した連鎖地図における連鎖群番号（塚崎ら，2004）

表1210-3 SSR座標識した「下仁田」における一般形質 a)

形質	下仁田	下仁田(A) b)	下仁田(B) c)	P値（F検定）	Tukey-Kramer HSD test (P=0.05)
葉鞘数 (本)	1.0	1.0	1.0	0.88	NS d)
株重 (g)	290	281	278	0.64	NS
葉身長 (mm)	473	481	490	0.26	NS
葉身折径 (mm)	55	55	54	0.75	NS
葉鞘長 (mm)	190	195	192	0.69	NS
葉鞘径 (mm)	28	26	26	0.20	NS
ピルビン酸（葉鞘部） (μg/ml)	18.5	17.7	17.7	0.62	NS
ピルビン酸（葉身部） (μg/ml)	16.8	19.0	19.1	0.21	NS
抽苔日（2005）	2/25	2/25	2/21	0.14	NS

a)：2004年4月26日播種、6月24日定植、11月9日収穫調査した。その後、雨よけハウスに移植し、抽苔日を調査した。
b)：2座について固定させたグループ
c)：4座について固定させたグループ
d)：有意差なし

エ 考 察

(ア) SSR マーカーによるネギ品種内 DNA 多型

Haishima ら（1993）は、アイソザイムによるネギ在来品種の品種内多型について述べているが、本研究において、F_1 品種を含め供試した全品種の SSR 座について品種内多型が存在することが明らかとなった。

ネギのような他殖性野菜においては、自殖弱勢を避ける必要から、ある程度の雑駁性を持たせた親系統を用いて F_1 品種が育成されていると考えられる。このため、既存品種では、品種識別や F_1 品種等の純度検定に SSR マーカーを用いることは極めて困難であると考えられる。そこで、品種同定を容易かつ正確に行うことを可能にする「品種標識法」を提案した。

(イ) 「下仁田」を用いた「品種標識法」の実証

「品種標識法」を用いて育成した「下仁田」 2 集団と原品種との比較栽培により、一般形質について

は原品種との有意差は認められず、本法の有効性を明らかにした。形質が十分揃い品種として仕上がった段階で本法を利用することにより、他殖性作物においても原品種の形質を維持しつつ、品種判別が可能な品種を作成できると考えられる。また本法は、ネギのみならず自殖弱勢が著しい他殖性作物全般に適用可能であり、品種内多型の存在によりDNAマーカーによる同定や純度検定が困難であった作物においても、品種同定やF_1純度検定を可能にする、簡便かつ有効な育種法であると考える。

オ　今後の課題

(ア)「品種標識法」により他品種との識別が可能となるF_1品種の育成

育成中の短葉性ネギ育種系統について「品種標識法」を利用して、他品種との識別が可能となるF_1品種を育成する。

カ　要　約

(ア) SSRマーカーによるネギ品種内DNA多型

F_1品種を含め、既存品種には高い品種内多型が存在し、品種を特定する遺伝子型を決めることは不可能と考えられた。そこで、品種内多型が存在する作物において、品種同定を容易かつ正確に行うことを可能にする「品種標識法」を提案した。

(イ)「品種標識法」の実証

「品種標識法」により育成した「下仁田」2集団と原品種との比較栽培を行い、本法の実証試験を行った。一般形質について有意差が認められなかったことから、形質が十分揃い品種として仕上がった段階で本法を利用することにより、他殖性作物においても原品種の形質を維持しつつ、品種判別が可能な品種を育成できると考えられる。

キ　引用文献

Haishima, M. Kato, J. and Ikehashi, H. 1993. Isozyme polymorphism in native varieties of Japanese bunching onion (Allium fistulosum L.). Japan J. Breed. 43:537-547

塚崎光・小原隆由・若生忠幸・山下謙一郎・小島昭夫 2004. 春まきネギの初期生育に関するQTL解析. 育種学研究6(別2):280

研究担当者(塚崎光*、小島昭夫、山下謙一郎、若生忠幸)

11　SSRマーカーによる低DNA多型頻度野菜の品種識別技術の開発

ア　研究目的

近年、農作物の品種識別を的確かつ迅速に行う必要性はますます増大しており、DNA多型を利用した品種識別法の確立が求められている。しかし、ナス科などの多型頻度のごく低い野菜においては、RFLPなどの従来手法では開発努力に見合うだけの多型が発見できないことが多い。また、その多型の検出の手法も多検体処理を行うためには極めて非効率的である。そこで、このような低DNA多型頻度の野菜品目に対し、多型頻度が高いと予想されるSSRマーカーの有効性を明らかにするとともに、マーカー開発法および多型検出法の効率化および自動化を行う。また、ここで開発した手法を元に、系統間多型頻度が低く在来品種も含めて多くの品種が商業的に栽培されているナスをモデルとして、系統間多型および系統内多型を調査し、DNA多型を利用した品種識別法確立のための基礎情報を得る。

イ　研究方法

(ア) DNA断片の3'末端を蛍光ジデオキシヌクレオチドで酵素的に末端標識する手法(Kukita et al. 2002)を元に、標識効率、擬陽性の有無、反応条件の検討等を行い、蛍光自動キャピラリシーケンサーを用いたDNA多型の安定かつ効率的なスクリーニングのための手法確立を行った。

(イ) 上記で確立された手法に基づき、約80のSSRマーカーを用いて、ジーンバンクに保存されている日本各地の代表的な在来ナス品種15品種である「南部長」、「河辺長」、「仙台長」、「民田」、「魚沼巾着」、「真黒」、「橘田」、「京もぎ」、「山科」、「加茂」、「晩生本黒長」、「津田長」、「十市」、「博多長」、「久留米長」の品種間多型をスクリーニングした。さらに、これら15品種を各16個体ずつ個体別に供試し、品種内多型の有無を検討した。

(ウ) 開発したSSRマーカーを用いて、大阪府の在来水ナス3系統と民間育成の水ナス品種および果形等の外観形質が類似した品種とを識別しうるマーカーを検索した。また、その結果選択された識別マーカーについて、各品種24個体を供試してマーカー型の系統内多型頻度を明らかにした。

a

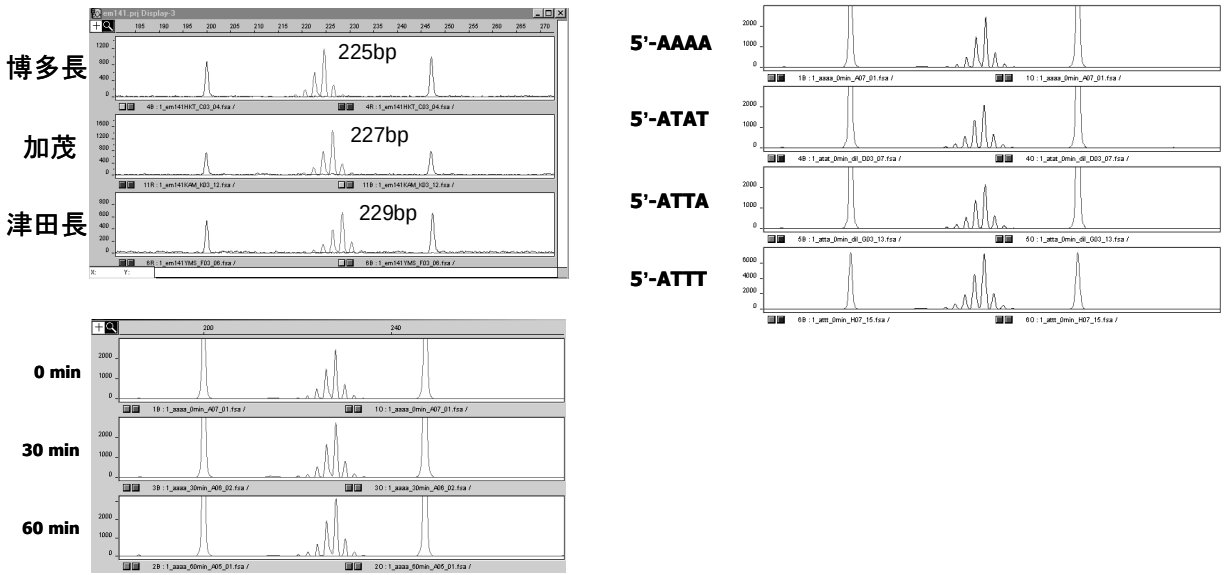


図1211-1　SSR 末端蛍光標識法の検討
a　3'末端蛍光標識法は、SSR の多型検出に適用可能な感度と解像度を示す。
b. 3'->5'exonuclease 活性によるアーティファクトの検討。末端に A が複数連続していても、検出結果は安定している。
c. 反応の安定性の検討。反応開始まで 1 時間放置されていても、検出結果は安定している。

ウ　研究結果

(ア) SSR マーカーの低コスト・ハイスループットな遺伝子型判定手法の確立

Kukita ら(2002)は DNA 断片の標識ヌクレオチドによる標識法により、蛍光標識プライマーを用いない高解像度のフラグメント解析が自動シーケンサーによって可能であると報告した。その工程の単純化やさらなる低コスト化をはかるため、工程の各段階について再検討を行った結果、酵素および標識ヌクレオチド濃度を原報の 1 / 3 量とし、反応後のエタノール沈殿による精製と蛍光標識 ddNTP のうち半量を非標識 dNTP に置換することにより、コストを削減するとともに標識反応を安定化させ得ることが明らかとなり、標識反応にかかる費用は原報のおよそ 1 / 5 以下に抑えることが可能となった。さらに、プライマーの末端配列構造や実験操作についても求められる条件を明らかにした（図1211-1)。

(イ) 低 DNA 多型頻度品目における SSR マーカーの有効性の検討と系統内 DNA 多型の評価

在来ナス品種15品種各 1 個体から DNA 試料を調製し、約80の SSR マーカーを用いて多型分析を行った。その結果、10個のマーカーにおいて系統間多型が認められ、最少で 5 個の SSR マーカーを用いてこれらの品種をお互いに識別可能であることが示唆された。

これらの15品種より16個体を供試し系統間多型を示した10の SSR マーカーを用いて個体別にジェノタイピングを行った。その結果、表1211-1に示すように、供試した15品種のうち「民田」を除く全ての品種が少なくとも 1 つ以上のマーカー座において品種内多型を示した。さらに、品種内に 3 つ以上のアリルの混在が認められるマーカー座も存在した。このことは、ナス在来品種においては品種内にも変異が存在しており、いわゆる純系として扱うことは品種識別法を確立する上では不適当であることを示している。さらに、ヘテロ接合の遺伝子型を示す個体も散見されたことから、ナスは自殖性野菜に分類されるものの、他の個体との交雑もかなりの頻度で起こっていることが示唆された。

表1211-1　各SSRマーカーにおける個体別の遺伝子型および10マーカーについて取りうる全遺伝子型パターン数

		SSRマーカー										遺伝子型のパターン数
		d01A01	d01A03	d01D08	d01F10	d02C11	d03E06	d04F11	d04G07	d05D12	d06A07	
品種名	南部長	BB	AA	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA,AB	BB,AB	9
	河辺長	AA,AB	AA,AC	AA	AA	BB	AA	BB	AA	AA	BB,AB	27
	仙台長	BB	AA,DD	AA	AA,AC,CC	BB,AA,AD	AA	BB	AA	AA	AA	24
	民田	AA	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	AA	BB	1
	魚沼巾着	AA	CC,AC	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA	BB,AB	9
	真黒	AA	AA	AA	AA	AA,AB,BB	AA	BB,BC	AA,AC,CC	BB,AB	AA,AB	243
	橘田	AA	CC,AA,BC,BB,AC	AA	BB,AB	EE	AA,AB,BB	BB	CC	AA	AA,AB	135
	加茂	AA	AA	AA, AB	AA,AB	AA,AB,BB	AA	AA,AB,BB	AA,AC	AA,AB,BB	AA,AB,BB	2186
	山科	AA	AA	AA	AA,AC,CC	CC,AC	AA	AA	AA,AC	AA	AA,AB	81
	京もぎ	AA	AA	AA	AA,AC	EE,CE,AE,CC	AA	AA,AB	CC,AA,AB,AC	AA,AC	AA,AB	2025
	晩生本黒長	AA,AB	AA,AC	CC,AC	CC,AC,AB	AA	AA	BB,AB,AA	BB,AB,AA,BC,BD	AA	BB	2835
	津田長	AA	DD,AA	CC,AC	AA,AC,CC	EE,AE	AA	BB,AB,AA	AA,AC	AA	AA,AB,BB	1458
	十市	AA	BB,AA	CC	AA	BB	AA	AA	AA,AC	AA	BB	6
	博多長	AA	CC,AA	CC,BC	BB,CC	AA,AD	AA	BB	AA,BB	AA	AA,BB	144
	久留米長	BB,AA	CC,AC	CC,BB	BB,BC,AB,CC	AA,AD,DD	AA	BB	AA	AA,AB	BB	540

(ｳ) 泉州水ナスをモデルとした適応可能性の検討

大阪府の在来水ナス系統およびそれに由来すると考えられる民間育成の水ナス品種、さらにこれらと果実の外観形質が類似するナス品種合計16品種各24個体を用いて、SSR マーカーを用いて個体別に多型解析を行った。系統内多型が認められた場合、最も頻度の高い遺伝子型を最頻遺伝子型とした。その結果、表1211-2に示すように、これら16品種は 6 つの SSR マーカーの最頻遺伝子型によって分類可能であることが明らかとなり、極めて性質の似た品種間でも識別が可能であることが示唆された。しかし、在来水ナス系統および民間育成の F_1 品種では著しい品種内多型は認められなかったものの、在来系統には著しいマーカー型の分離を示すものが存在し、栄養繁殖性作物と同様の 1 品種 1 DNA タイプを前提とした技術開発は困難であることが明らかとなった。

表1211-2　在来水ナスおよびその類似品種の最頻 SSR マーカー型および系統内分離

		在来水ナス(自家採種)			民間育成水ナスF1品種					在来および民間育成水ナス類似品種							
マーカー名		SMN	SMK	KSW	YWR	KKM	MZN	SIS	BIN	JZN	GWD	TSK	AOM	HGR	BNA	BNY	SNR
EMB01P20	最頻	**AA**	AA	AA	**AA**	**BB**	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
	個体別	AA	AA	AA23 AB1	AA	BB12 AA8 AB4	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
emd05F05	最頻	**AA**	**BB**	AA	**AA**	AA	**AC**	AA	**CC**	BB	**AA**	AA	**BB**	AA	AD	AA	**AC**
	個体別	AA	BB23 AB1	AA	AA	AA	AC	AA	CC	BB22 AB2	AA	AA	BB6 AA13 AB5	AA	AD	AA13 AC11	AC
emh21M11	最頻	**AA**	**DD**	DD	**DD**	DD	**CD**	**DD**	CC	DD	**CD**	**AD**	**CC**	**AD**	DD	**AD**	**DD**
	個体別	AA	DD23 AD1	DD	DD	DD	CD	DD	CC	DD23 AD1	CD19 DD5	AD	BB7 CC11 BC6	AD	DD	AD	DD
EMB01I03	最頻	AA	AA	**BB**	**AA**	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	**BB**	AA	AA
	個体別	AA	AA	BB AB1	AA	AA23 AB1	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	BB	AA23 AC1	AA
emg21I17	最頻	AA	**AA**	AA	AA	AA	AA	AA	AA	**BB**	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
	個体別	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
emf11O23	最頻	AA	AA	**AA**	**AA**	AA	BC	**AC**	BB	AA	AA	**AC**	BB	**AA**	**CC**	**BC**	BC
	個体別	AA23 AC1	AA	AA	AA	AA	BC	AC	BB	AA23 AB1	AA	AC	BB10 DD9 AA3 AB1 BD1	AA	CC	BC18 CC6	BC

※黒地白抜き文字は、それぞれの品種を一意に識別可能な最頻マーカー型を示す。個体別の項はマーカー型および調査した24個体における出現数を示す。

エ　考察

(ア) SSR マーカーの検出法の改良

SSR マーカーはその多型検出能の高さから、品種識別をはじめ DNA 多型を利用する多くの場面で頻繁に用いられるようになってきている。特定の遺伝子座の多型を多検体について検出するためには蛍光プライマーを用いたキャピラリ電気泳動法が高解像度であり結果も安定しているため、最も適した手法であると考えられる。しかし、自殖性野菜のように系統間多型頻度が低い対象について品種識別法を開発する上では、蛍光プライマーを用いた多型のスクリーニングはコストパフォーマンスの点から不適当である場面が多く、開発効率を犠牲にしても銀染色法や抗体染色法を併用した従来式のアクリルアミド電気泳動法が用いられることが多い。改良したプロトコールにおいて、標識反応にかかる費用は 1 サンプル当たり15～20円程度となり、原報のおよそ 1 / 5 以下に抑えることが可能となった。単一の蛍光標識プライマーを数百回用いるのでなければ、ポストラベル法の方が経済的であると試算され、多くのプライマーが系統間多型を示さないために数サンプルに供試されただけで廃棄される手法開発の現場では極めて有効な手法であると考えられる。

(イ) 品種識別法としての SSR マーカーの適用性

本研究において、供試した在来ナス品種15品種において、約80の SSR マーカーのうち10個において多型が認められた。系統内多型の問題を一端おいて最頻遺伝子型で議論する限りにおいては、最少で 5 個の SSR マーカーを用いてこれらの品種をお互いに識別可能であった。さらに、類縁関係が深いと予想される在来水ナス系統および類似の民間育成系統においても、すべての品種を 6 つのマーカーで識別可能であった。この結果は、これまで AFLP や RAPD などの多型検出能が高いとされたマーカー技術よりも SSR マーカーは格段に効率的であり、低多型頻度の野菜において極めて有効なマーカーであることを示すものである。

(ウ) 自殖性野菜における系統内多型

一般に自殖性作物の育種は自殖と系統選抜を繰り返すことによって行われる。自家受粉を繰り返し固定が図られ、品種として完成した段階では遺伝的に固定した純系となっているとされている。また、F_1 品種の場合も純系である 2 つの親系統の交雑第 1 代を品種とすることから、品種内の各個体は遺伝的に均一であるとされている。したがって、自殖性野菜における品種内の各個体は栄養繁殖性野菜と同様に均一であると認識されてきた。しかし本研究により、自殖性野菜でも遺伝的な均一性を前提とした技術開発は困難であることが明らかになってきた。表1211-1の結果からは、橘田、加茂ナス、久留米長など、 6 つの品種が 1 つ以上のマーカーについてヘテロ接合状態であることがみてとれる。このことは、ヘテロ接合型を示した品種ではマーカー遺伝子座について固定していないことを示すとともに、たまたまホモ接合型とみられた遺伝子座についても、多くの個体を調査すれば固定していない座位が見つかってくる可能性があることを示している。このように、農業形質については均一と見える品種であっても、DNA レベルでは必ずしも均一ではないことがわかる。16個体中に見いだされる全ての遺伝子型を考慮すると、供試した個体の自殖後代では用いた10種のマーカーについて最大で2,800を越える遺伝子型が混在することになり、多くの品種がお互いに同じ遺伝子型を持ちうることが明らかとなった。また、広く栽培されている水ナスおよびその類縁系統においても、これらを識別するためには品種内多型を無視することはできないことが示唆される。

オ　今後の課題

SSR マーカーはその多型頻度の高さから、本研究で用いた自殖性野菜のような系統間多型頻度の低い品目においても有効な品種識別の手法開発手段となりうると考えられる。しかし、もともと自然突然変異率が高い構造であることから、その変異頻度が実用上無視できる程度であることを明らかにする必要があると考えられる。

一方、前述のように系統内にも一定の変異を内包し、その頻度も系統によって異なっている野菜品種の現状に基づいた DNA 品種識別法を開発するためには、各々のアリルの遺伝子頻度や他殖率の正確な推定に基づいた数量遺伝学的なモデル構築が必要である。しかし、このような戦略を実際に利用できる技術として確立するまでには、大きな困難が伴うと予想される。むしろ、このような集団から、品種としての形質を評価しつつマーカーを利用した系統の純化を行い、マーカー型によって区別できる独自の系統育成を行うことが実効的であると考えられる（福

岡 2004)。そのための制度整備も今後の課題として重要である。

カ　要約

低コスト・安定な SSR マーカーの多型検出手法を確立し、系統間多型頻度の低い自殖性野菜等の品目においても有効な品種識別の手法開発手段となりうることを示すとともに、自殖性野菜における品種識別法開発において潜在する系統内多型の問題を明らかにした。

キ　引用文献

Yoji Kukita and Kenshi Hayashi 2002. Multicolor Post-PCR Labeling of DNA Fragments with Fluorescent ddNTPs. BioTechniques 33: 502-506.

福岡浩之 2004. 野菜の DNA 品種識別法確立に向けての技術的問題点とその方策　農及園. 79: 175-179.

研究担当者（福岡浩之*、大山暁男、布目司、宮武宏治）

12　野菜類加工製品における品種判別の検証

ア　研究目的

輸入食品は生産地が身近でないため、偽装表示等により一度信頼が失われるとその回復には長期を要することが多い。表示に不正が発覚すると、消費者の購買動向への影響は計り知れないものがある。それらの不正を抑止し、消費者の信頼を得るために、漬物・キムチに関する表示裏付け技術の開発を目指す。本課題では、漬物の中で仕入れ原料の輸入割合が50%程度あるナス漬と輸入キムチのなかで主となる白菜キムチについて、DNA 分析による不正表示防止技術の開発を行う。

イ　研究方法

(ｱ) SSR マーカーによる漬物用ナス品種判別技術の開発

漬物用として主に利用されるナスの品種判別技術の開発を目指した。30種のナスからゲノム DNA を抽出し、野菜研育種工学研究室で開発された SSR マーカーを PCR にて増幅し、多型をキャピラリーシークエンサーにて検出した。

(ｲ) 利用場面に対応した SSR マーカーによるナス品種判別手法の検討

DNA 分析による品種判別技術は、中小零細商店や大手スーパー、生協、DNA 鑑定企業、公的検定所等あらゆるところでの利用が想定される。そこで、それぞれの場面で最適な品種判別手法を探るために、品種判別用ナス SSR マーカーの検出をキャピラリーシークエンサー、マイクロチップ電気泳動装置、アガロースゲルの 3 種の手法で行い、比較した。

(ｳ) SSR マーカーによるキムチ用ハクサイ品種判別技術の開発

白菜キムチの原材料であるハクサイが輸入品か国産品かを判別するため、白菜キムチ用として主に利用されるハクサイの品種判別技術の開発を目指した。それぞれの16種のハクサイからゲノム DNA を抽出し、野菜研遺伝特性研究室で開発された SSR マーカーを PCR にて増幅し、多型をキャピラリーシークエンサーにて検出した。

(ｴ) STS マーカーを用いたキムチ中ニンニク原産地判別技術の開発

白菜キムチの原材料であるニンニクの検定により輸入品か国産品かを判別するため、中国産または国産ニンニクを判別できる STS マーカーの開発を目指した。中国産および国産ニンニクからゲノム DNA を抽出し、ランダムプライマーにて PCR を行い、多型を示した増幅バンドの STS 化を検討した。

(ｵ) キムチ漬け液中乳酸菌叢 DNA 分析による原産地判別技術の開発

白菜キムチ漬け液中にある乳酸菌の菌叢を DNA 分析することにより、輸入品か国産品かを判別する技術の開発を目指した。市販の白菜キムチ漬け液から DNA を抽出し、それらを鋳型として、乳酸菌 *Leuconostoc* 属の検出法として *Leuconostoc*-multiplex PCR 法を、また乳酸菌 *Lactobacillus* 属の検出法として *Lactobacillus*-multiplex PCR 法を試みた。

ウ　研究結果

(ｱ) SSR マーカーによる漬物用ナス品種判別技術の開発

漬物用ナス品種30種を 6 種類の SSR マーカーでジェノタイピングし（表1212-1）、21グループに分類することが可能であった（図1212-1）。21グループの内18グループは 1 品種のみで、すなわち品種判別が可能であった。

表1212-1　漬物用ナス品種のジェノタイプ

品種・系統	SSRマーカー					
	SSR-B	SSR-G	SSR-H	SSR-I	SSR-J	SSR-K
梵天丸・山形	DD	AA	AC	BB	BB	CC
梵天丸・秋田	CC	BD	CC	BB	BB	BC
青丸なす	AA	AA	DD	CC	BB	EE
羽黒一口丸茄子	CC	AA	BB	BB	BB	CC
極早生大丸	DE	AA	CC	BB	AA	CC
太助大丸	BB	AD	BD	BB	AB	CC
早生大丸	DD	AD	DD	BB	AA	DD
民田茄子	CC	AA	BB	BB	BB	CC
くろわし	BB	CC	CC	AD	AB	DD
殿様茄子	CC	AA	BB	BB	AB	CC
黒帝	CC	BB	CC	BB	BB	CC
千両2号	CC	AA	CC	BB	BB	CC
小五郎	CC	AA	EE	BB	BB	CC
竜馬	CC	AD	CC	BB	BB	CC
千両	CC	AA	CC	BB	BB	CC
式部	CC	AA	CC	BB	BB	CC
黒潮	CC	BD	CC	BB	BB	CC
兆民	CC	AA	CC	BB	BB	CC
真仙中長	DD	AD	BB	BB	BB	CC
筑陽	CC	AA	CC	BB	BB	CC
黒陽	CC	AA	CC	BB	BB	CC
飛天長	CC	AA	CC	BB	BB	CC
庄屋大長	CC	AA	CC	BB	BB	DD
墨染長	CC	AA	CC	BB	BB	CC
水ナス在来系統	BB	DD	FF	CC	AA	DD
絹皮水茄子	BB	DD	FF	BB	AA	DD
美男	CC	AA	BB	BB	BB	AC
紫水	DD	DD	CC	BB	AA	AD
みず茄	CC	AD	CC	BB	AB	AA
柔	BB	DD	FF	BB	AA	DD

1)各 SSR マーカーごとに、同じサイズのピークを同じ英字で示した。

図1212-1　SSR マーカーによる30品種の分類

(ｲ) 利用場面に対応した SSR マーカーによるナス品種判別手法の検討

SSR マーカーによる品種判別法とし、シークエンサー検定法・マイクロチップ検定法（写真1212-1）・アガロースゲル検定法の 3 種の検定法を開発した。それらを検定感度、コスト、利便性等の面から比較すると、シークエンサー検定法は多品目大量検定に、マイクロチップ検定法は多品目少量検定に、アガロースゲル検定法は 1 品目少量検定に利用し易いことが明らかとなった（表1212-2）（谷本他2005、谷本他2006a）。

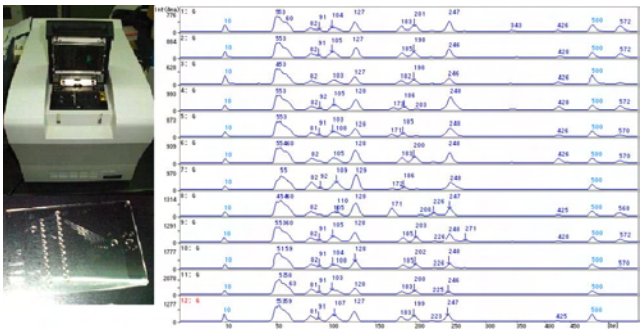


写真1212-1　マイクロチップ電気泳動法
1)左上：装置、左下：泳動チップ
右：泳動チャート

表1212-2　３種類の SSR マーカー検定法の比較

	SSR-シークエンサ検定法	SSR-マイクロチップ検定法	SSR-アガロースゲル検定法
検定可能品種	大多数	大多数	1部不可能
検定時間（泳動処理のみ）	約40-50分／1検体	約10分／12検体	約2－4時間／10検体
機器コスト	1000万円程度	300万円程度	15-25万円程度
試薬コスト	1000-1500円／検体	100-200円／検体	20-30円／検体
最適な利用形態	自動化が可能なので、多品目・大量処理の検定	短時間、低コストなので、多品目・少量の検定	特に低コストな手法なので、品種を限定して、少量の検定
備　考	アプライド製キャピラリー電気泳動装置を使用	日立マイクロチップ電気泳動装置(コスモアイ)を使用	ミュービット電気泳動装置を使用

(ｳ) SSR マーカーによるキムチ用ハクサイ品種判別技術の開発

他殖性植物であるハクサイでは品種内での多型が多いと予想し、1 品種30個体の SSR マーカーサイズを調べたが、ほとんどのマーカーおよび品種においてサイズのばらつきはなかった。すなわち、ハクサイの品種判別に SSR マーカーが利用できることが確認された。ただし、一部同一品種内でサイズにばらつきが生じる SSR マーカーが見られたが、そのような SSR マーカーについては、品種判別用マーカーから除外した。最終的に、キムチ用ハクサイ品種16種を 4 種類の SSR マーカーでジェノタイピングし（表1212-3）、15グループに分類することが可能となった（図1212-2）（古川他2006）。すなわち、2 種のみ同じグループで、他の14種は品種判別が可能であった。

表1212-3　キムチ用ハクサイ品種のジェノタイプ

品種	SSRマーカー			
	BRMS026	BRMS043	BRMS036	BRMS051
オレンジクイン	DF	CD	AD	CE
大福	CH	BD	AD	AC
黄苑75	CH	BB	AD	AC
CR清雅75	CC	BD	AD	CE
黄月70	CC	BD	AD	CE
彩星	EI	DD	BD	CE
うたげ	BG	BD	CD	CE
黄皇85	II	BD	AD	CE
CR黄駒	BI	BD	AD	CD
キムチエース	DH	AD	AD	AC
坂東	AJ	AD	CD	BE
黄ごころ85	EJ	BD	CD	AC
黄久娘80	BH	BB	CD	AC
華黄	CC	BD	CD	AC
黄まじめ	BH	AD	CD	AC
黄波90	CC	DD	CD	BE

1)各SSRマーカーごとに、同じサイズのピークを同じ英字で示した。

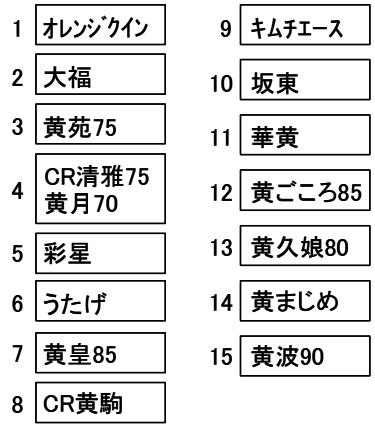


図1212-2　SSRマーカーによる16品種の分類

(エ) STS マーカーを用いたキムチ中ニンニク原産地判別技術の開発

国内産間や中国産間および中国産乾燥スライスニンニク間に多型を示さず、それぞれの国内外産間には多型を示す12種の多型バンドが分離された（写真1212-2）。さらに、それらの配列情報から STS マーカー用プライマーを設計し、それぞれのプライマーセットにて供試したニンニクゲノム DNA を鋳型に PCR を行った。その結果、中国産ニンニクのみで目的とする335b の増殖バンドが検出される C 5 -2 STS マーカーが確立された（写真1212-3）（谷本他2006b）。

(オ) キムチ漬け液中乳酸菌叢 DNA 分析による原産地判別技術の開発

国産 7 種類、韓国産 4 種類の市販キムチについて、*Leuconostoc* 属および *Lactobacillus* 属の菌叢を調べた結果、*Lactobacillus* 属では一定の傾向は見られなかったが、*Leuconostoc* 属では、国産にはない *Leuconostoc gelidum* が韓国産の 4 製品中 3 製品に存在した（写真1212-4）（西岡他2006）。

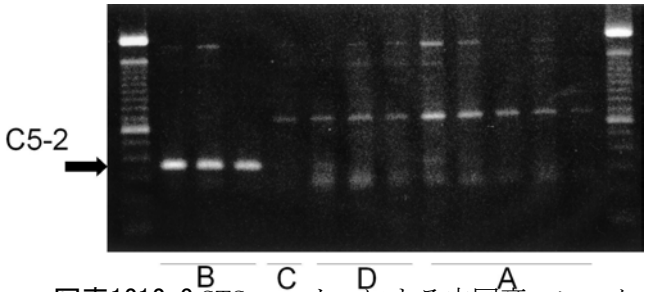


写真1212-3 STS マーカーによる中国産ニンニクの検出
1)A:国産ニンニク、B:中国産ニンニク、
C:中国産プチニンニク
D:中国産乾燥スライスニンニク

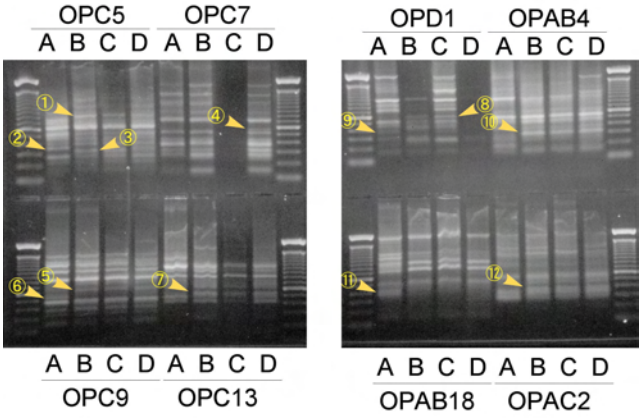


写真1212-2　日本・中国産ニンニク多型バンドの検索
1)A:国産ニンニク、B:中国産ニンニク、
C:中国産プチニンニク
D:中国産乾燥スライスニンニク

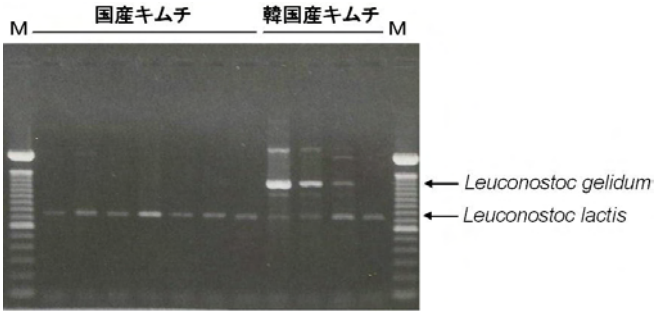


写真1212-4　*Leuconostoc*-multiplex PCR 法によるキムチ漬け液中乳酸菌の検出

工　考　察

(ア) SSR マーカーによる漬物用ナス品種判別技術の開発

30品種中18品種を特定できるようになったが、残り12品種、特に千両二号等 8 品種を含む 1 グループ

が同じジェノタイプとして残った。今後は、非常に遺伝的に近い品種が判別できる SSR マーカーの開発が必要である。

(ｲ) 利用場面に対応した SSR マーカーによるナス品種判別手法の検討

マイクロチップ検定法は、短時間で検定が可能な上、SSR マーカーを用いる場合検定感度も高く、装置やランニングのコストも、シークエンサーと比較すると低く抑えられることから、スーパーや生協等の流通・販売の現場での検定に最適な手法である。一方、シークエンサー検定法は、DNA 判別専門業務の企業や公的機関等で、アガロース検定法は、零細な商店や個人で、手法が確立しているものの検定を行うのに適した手法である。

(ｳ) SSR マーカーによるキムチ用ハクサイ品種判別技術の開発

他殖性植物のハクサイでは、アリール数の多い SSR マーカーを用いることにより、判別の効率を上げることができ、4 種類の SSR マーカーでほとんどの品種特定が可能となった。

(ｴ) STS マーカーを用いたキムチ中ニンニク原産地判別技術の開発

中国産ニンニクを判別できる STS マーカーC 5 -2 を開発したが、ニンニクの品種・系統は中国では無数にあり現地在来種も多い。さらに多くの STS マーカーを開発し、複数のマーカーによる判別技術が必要と考える。

(ｵ) キムチ漬け液中乳酸菌叢 DNA 分析による原産地判別技術の開発

韓国産キムチでは、1 製品を除き、国産では見られない乳酸菌が確認されたことから、この菌叢の違いを白菜キムチの原産地判別に利用できると考えられた。ただし、検討した試料数が少ないため、今後の確認が必要と考える。

オ　今後の課題

(ｱ) SSR マーカーによる漬物用ナス品種判別技術の開発

SSR マーカー数を増やし、判別可能なナス品種数を拡大させることが必要である。アガロースゲル等簡便法でも多型の検出が容易に行えるように、品種間での PCR 増幅産物サイズの違いが大きい SSR マーカーの選抜も必要である。

(ｲ) 利用場面に対応した SSR マーカーによるナス品種判別手法の検討

マイクロチップ検定法がさらに現場で普及されるように、手法の簡素化、マニュアル化を進めていきたい。

(ｳ) SSR マーカーによるキムチ用ハクサイ品種判別技術の開発

今後は、品種判別が可能なハクサイ品種数を拡大するために、使用する SSR マーカー数を増やしていく予定である。

(ｴ) STS マーカーを用いたキムチ中ニンニク原産地判別技術の開発

判別精度の向上を考えると、さらに異なる多型を示す複数の STS マーカーの開発が必要である。また、白菜キムチから精度の高いニンニクゲノム DNA の抽出法の確立も必要である。

(ｵ) キムチ漬け液中乳酸菌叢 DNA 分析による原産地判別技術の開発

今回検討を行えなかった中国産キムチを含め、更に試料数を増やす必要がある。また今回検出の対象とした乳酸菌の菌種は限られており、原産地による違いが見られたものも一種のみであった。今後、幅広い微生物を対象とする変成剤濃度勾配電気泳動法（PCR-DGGE）を導入し、原産地による菌叢の差異を検討する。

カ　要　約

(ｱ) SSR マーカーによる漬物用ナス品種判別技術の開発

漬物用ナス品種30種を 6 種類の SSR マーカーで21グループに分類することが可能であった。21グループの内18グループは 1 品種のみで、すなわち18品種は品種判別技術が確立された。

(ｲ) 利用場面に対応した SSR マーカーによるナス品種判別手法の検討

SSR マーカーによる品種判別法とし、シークエンサー検定法・マイクロチップ検定法・アガロースゲル検定法の 3 種の検定法を開発した。マイクロチップ検定法は、短時間で検定が可能な上、検定感度も高く、装置やランニングのコストも、シークエンサーと比較すると低く抑えられることから、スーパーや生協等の流通・販売の現場での検定に最適な手法であった。

(ｳ) SSR マーカーによるキムチ用ハクサイ品種判別技術の開発

キムチ用ハクサイ品種16種を 4 種類の SSR マーカーで15グループに分類することが可能となった。すなわち、 2 種のみ同じグループで、他の14種は品種判別技術が確立された。

(ｴ) STS マーカーを用いたキムチ中ニンニク原産地判別技術の開発

数種のニンニクから抽出したゲノム DNA を用いて、ランダムプライマーにて PCR を行い、12種の多型バンドを分離した。その 1 種から、中国産ニンニクのみで目的とする335b の増殖バンドが検出される C5-2 STS マーカーが確立された。

(ｵ) キムチ漬け液中乳酸菌叢 DNA 分析による原産地判別技術の開発

国産、韓国産市販白菜キムチ漬け液中から DNA を抽出し、それらを鋳型として、multiplex PCR 法により、乳酸菌 *Leuconostoc* 属と *Lactobacillus* 属の検出を試みた。その結果、*Lactobacillus* 属では一定の傾向は見られなかったが、*Leuconostoc* 属では、国産にはない *Leuconostoc gelidum* が韓国産の 4 製品中 3 製品に存在した。このため、*Leuconostoc* 属の菌叢の違いを原産地判別に利用できると考えられた。

キ　引用文献

古川　真・谷本　秀夫・橘田　浩二・西岡　輝美. 2006. ハクサイ加工品（キムチ）の材料品種判別における SSR マーカーの利用. 園芸学会雑誌. 75別1：422.

Lee, H.-J., Park, S.-Y., and Kim, Jeongho. 2000. Multiplex PCR-based detection and identification of *Leuconostoc* species. FEMS Microbiology Letters. 193:243-247.

西岡　輝美・谷本　秀夫・古川　真・橘田　浩二. 2006. 漬け液中の乳酸菌叢の差異を用いたキムチの産地判別法. 園芸学会雑誌. 75別 1 ：423.

Song, Y.-L., Kato, N., Liu, C.-X., Matsumiya, Y., Kato, H., and Watanabe, K. 2000. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. FEMS Microbiology Letters. 187:167-173.

谷本　秀夫・古川　真・布目　司・福岡浩之. 2005. SSR マーカーによるナス品種識別法の開発. 園芸学会雑誌. 74別1：197.

谷本　秀夫・古川　真・布目　司・福岡浩之. 2006a. SSR マーカーによるナス品種識別法の開発. 大阪食とみどり技セ研報. 42：5-10

谷本　秀夫・古川　真・橘田　浩二・西岡　輝美. 2006b. STS マーカーによるキムチ中ニンニク識別法の開発. 園芸学会雑誌. 75別 1 ：421.

研究担当者（谷本秀夫*、古川　真、橘田浩二、西岡輝美）

13　窒素安定同位体比の解析による有機農産物の判別技術の開発

ア　研究目的

2001年 4 月から有機農産物の認証制度が改正 JAS 法のもと始まったが、店頭に並ぶ「有機農産物」が本当に有機質肥料で栽培されたかどうかの判別法は確立していない。

有機農産物（無農薬かつ無化学肥料）を通常栽培の農産物と判別する場合、無農薬か否かの判別は残留農薬の分析で行うことができるが、無化学肥料か否かを判別する方法はこれまで提案されていない。本研究では、その判別法として、自然界における窒素の動態を調べる研究等に使われている窒素安定同位体比（$\delta^{15}N$ 値　＊1）に注目した。$\delta^{15}N$ 値は堆肥等で高く、化学肥料で低いことから、この高低がこれら窒素分を吸収した作物中の窒素分の $\delta^{15}N$ 値にも反映するかどうかを調べ、農産物の $\delta^{15}N$ 値の分析によりその農産物が、無化学肥料で栽培されたかどうかを判別する技術を開発する。

＊1 ：$\delta^{15}N$ 値は、^{15}N の ^{14}N に対する比（$R=^{15}N/^{14}N$）について、標準試料（大気中窒素）の値との差から次のように計算される値であり、‰（パーミル　千分率）で表示される。

$$\delta^{15}N=[R\text{（試料）}/R\text{（標準試料）}-1]\times1000 \quad (‰)$$

イ　研究方法

(ｱ) 有機 JAS 認証野菜と通常栽培野菜の $\delta^{15}N$ 値の比較

有機 JAS 認証の野菜と、店頭に並ぶ通常栽培の野菜を入手し、$\delta^{15}N$ 値を分析した。

a　野菜の入手

有機 JAS 認証の 5 種類の果菜類（トマト、キュウリ、ナス、シシトウ、カボチャ）を熊本県の有機農産物認証団体から入手し、比較対象の通常栽培の果菜類は熊本市内のスーパーより購入した。

b　窒素安定同位体比の分析

それぞれの野菜の 3 個体ずつを無作為に選択し、細断、縮分して適当量の試料とし、凍結乾燥した。それを粉砕後、試料をスズカップに封入し、質量分析計（ANCA-SL、Europa 社）によって $\delta^{15}N$ 値を測定した。

(ｲ) 各地で生産された有機、無機栽培野菜の $\delta^{15}N$ 値の比較

a　野菜の入手

全国展開大型スーパーの契約農家で生産した野菜35点、店頭購入の野菜71点、合計106点の試料を得た。これら野菜の生産地域は、国内18県および中国であり、野菜の種類は25品目であった。有機栽培表示のものが46点、同表示なしの試料が60点であった。

民間および公立の研究機関の試験圃場において栽培された野菜（ 7 品目、129点）を入手した。民間研究機関では JA 全農の肥料研究室、公立研究機関では大分県農業技術センター、福岡県総合農業試験場、三重県科学技術振興センター、および石川県農業総合研究センターから試料の提供を受けた。各研究機関の化学肥料施用区、有機物施用区などの施肥条件を一定とした試験圃場の生産物を用いた。

b　野菜および肥料の窒素安定同位体比の分析

野菜試料は縮分し、凍結乾燥した後、微粉砕した。肥料についても同様の処理を行った。

微粉砕試料はスズカプセルに封入し、質量分析計（ANCA-SL、Europa 社）によって窒素安定同位体比を分析し、$\delta^{15}N$ 値を算出した。

(ｳ) イチゴの $\delta^{15}N$ 値に及ぼす肥料および土壌窒素の影響

野菜の $\delta^{15}N$ 値から、その野菜が化学肥料で育てられたか、または有機質肥料で育てられたかを判別することができるかを検討した。国内の研究機関より提供を受けた土壌を用い、供試作物はイチゴとし、ポット栽培条件で検討した。

a　供試土壌

7 県（福島、長野、福井、三重、愛知、山口、徳島）にある公立試験研究機関に依頼して土壌の提供を受け、供試した。

b　施肥および栽培条件

1 /5000 a ポットで実験を行い、処理区は、化学肥料、有機肥料および無肥料の 3 区とした。化学肥料区は各ポットに CDU 化成 S222を窒素で 1 g 加え、有機肥料区は牛糞鶏糞ペレット堆肥を窒素で 1 g 加えた。 3 反復を設けた。

イチゴ‘章姫’の購入苗を各ポットに定植し、11月 7 日より収穫を始め、そのポットで最初に収穫した果実をそのポットの分析試料とした。

c　野菜、肥料および土壌の窒素安定同位体比分析

イチゴ果実は凍結乾燥した後、微粉砕した。肥料および各土壌も、乾燥後、微粉砕した。微粉砕試料はスズカプセルに封入し、安定同位体比分析装置（EA1110-DELTAplus Advantage ConFloⅢ System、Thermo Finnigan 社）によって窒素安定同位体比を分析した。

(ｴ) トマトの $\delta^{15}N$ 値に及ぼす肥料および土壌窒素の影響についての各地での比較試験

トマト果実の $\delta^{15}N$ 値が肥料および土壌窒素の $\delta^{15}N$ 値の影響をどのように受けるか、土壌、気候の異なる各地の研究機関で比較試験を実施した。

a　トマト栽培依頼機関

11道県内の研究機関（北海道立花・野菜技術センター、福島県農業試験場、群馬県農業技術センター、長野県南信農業試験場、福井県農業試験場、静岡県農業試験場、兵庫県淡路農業技術センター、徳島県立農林水産総合技術支援センター農業研究所、山口県農業試験場、佐賀県上場営農センター、熊本県農産園芸研究所および（独）野菜茶業研究所（武豊））に依頼した。

b　トマトの栽培条件

各研究機関には、トマト種子、肥料等を一式送付して、栽培を依頼した。品種は「ルネッサンス」、有機肥料は牛糞堆肥と鶏糞堆肥を混合したペレット堆肥、化学肥料は CDU 化成 S222とした。処理区は、有機肥料区、化学肥料区および無肥料区の 3 区とした。各区にトマト 5 株を定植し、 2 段花房の上で摘芯した。 1 段および 2 段果房の果実を採取し、野菜茶業研究所まで送付してもらい、依頼分析により $\delta^{15}N$ 値を分析した。

ウ　研究結果

(ｱ) 有機 JAS 認証野菜と通常栽培野菜のδ^{15}N 値の比較

熊本県下で栽培された 5 種類の有機 JAS 認証野菜（「表示有り」）と、同じ 5 種類の通常栽培野菜（「表示なし」）のδ^{15}N 値を図1213-1に示した。「表示有り」野菜のδ^{15}N 値は+ 6 ～+10‰の間の値をとり、「表示なし」野菜では-0.3～+4.05‰の間の値をとった。つまり 5 種類の野菜のδ^{15}N 値は、+ 5 ‰を境として、全ての野菜で「表示有り」野菜ではそれ以上であり、通常栽培野菜ではそれ以下の値となった（中野・上原・渡邊　2002)。

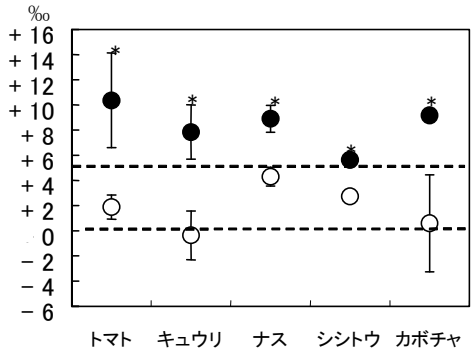


図 1213-1　5 種類の果菜類の有機 JAS 表示の有無とδ^{15}N 値の関係
●:有機 JAS 表示あり，　○:有機 JAS 表示無し.
値は 3 個体の平均値，縦棒は標準偏差を示す.
ns は有意差無し，*は 5%の危険率で有意差あり.

(ｲ) 各地で生産された有機、無機栽培野菜のδ^{15}N 値の比較

各地で生産された市場流通野菜106点、および民間、公立研究所で有機、無機栽培された野菜129点を収集して、δ^{15}N 値を分析した。

市場流通野菜では、有機農産物表示の野菜のδ^{15}N 値は、同表示なしの通常栽培野菜よりも高い傾向が認められた。基準値として+4.0‰をとると、有機農産物表示のあった野菜では80.4%が+4.0‰以上の値を取り、一方同表示なしの野菜は+4.0‰以上のものは45%だけであった。

民間、公立研究所において栽培された野菜では、有機物施用区の野菜のδ^{15}N 値は、化学肥料施用区の野菜のそれよりも高い傾向が認められた。基準値として+4.0‰をとると、有機物施用区の野菜の97.6%が+4.0‰以上の値を取ったのに対して、化学肥料施用区の野菜では+4.0‰以上のものの割合は32.2%だけであった（中野・上原　2004)。

(ｳ) イチゴのδ^{15}N 値に及ぼす肥料および土壌窒素の影響

国内各地から集めた 7 種類の土壌を用いて、有機肥料または化学肥料を施用してイチゴを栽培し、収穫果実のδ^{15}N 値を調べた。

イチゴ果実のδ^{15}N 値は施肥の影響を受け、有機肥料区＞無肥料区＞化学肥料区の順となった。化学肥料区のδ^{15}N 値は-2.8～+1.7‰の範囲に入り、化学肥料そのもののδ^{15}N 値-1.6‰の付近に分散していた。有機肥料区のδ^{15}N 値は+6.0～+11.3‰の範囲にあり、有機肥料そのもののδ^{15}N 値+9.9‰の付近に分散していた。

土壌と果実のδ^{15}N 値の相関を見ると、無肥料区では、δ^{15}N 値（果実）＝0.85δ^{15}N 値（土壌）+0.196 で近似され、果実のδ^{15}N 値は土壌のδ^{15}N 値を反映し相関が高いことが示された（R＝0.731）（中野・上原　2006)。

(ｴ) トマトのδ^{15}N 値に及ぼす肥料および土壌窒素の影響についての各地での比較試験

11土壌のδ^{15}N 値は＋5.9～＋12.3‰(平均＋9.4‰)の範囲であり、差があった。

果実のδ^{15}N 値について、化学肥料区と有機肥料区を比較すると、有機肥料区が化学肥料区よりも高い値であった。熊本のみ両区でほとんど差がない結果となった。熊本では試験圃場の前作で多肥の栽培が行われており、下層土中に化学肥料の残効があったことが推定された。

果実のδ^{15}N 値は、区に係わらず試験地毎の変動が大きいことが示された。δ^{15}N 値の変動幅は、無肥料区で14.6‰、化学区で11.1‰、有機区で13.0‰と、大きな値でかつ相互に大きな差異は認められなかった。この結果は、どの試験地でも果実のδ^{15}N 値は土壌窒素のδ^{15}N 値によって大きく影響を受けていたことを示している。本試験では施肥量は少なめであり、この場合、土壌由来の窒素の吸収量が多くなり、土壌のδ^{15}N 値の影響が相対的に大きくなったことが考えられる。もう一つには、本試験は通常の土耕栽培であったため、ポット栽培とは異なり根域が広く、土壌からの窒素供給がより大きな割合を占めたことが推定された。

本試験の結果から、最初の作付けで、しかも施肥量が少ない場合は、δ^{15}N 値による施肥判別が難しくなることも明らかとなった。隔離床栽培など土壌の

影響が相対的に小さい場合ほど施肥による判別は容易になると考えられた。

エ　考　察

(ｱ) 有機 JAS 認証野菜と通常栽培野菜の $\delta^{15}N$ 値の比較

供試した 5 種類の野菜全てについて、「有機 JAS 表示あり」野菜の $\delta^{15}N$ 値は+５‰以上となり、通常栽培の「表示なし」野菜では、+５‰以下の値となった。この結果は、その野菜が有機質肥料で栽培されたか、または化学肥料で栽培されたかを生産物の $\delta^{15}N$ 値によって判別できる可能性を示すものである。「表示有り」野菜の生産圃場は二十数年来、化学肥料、農薬を使用していないとのことである。そして、投入有機物の種類は畦草、稲ワラ、豚糞、牛糞、油粕、米糠などで、毎年10a 当たり１～1.5トンを投入しているとのことである。豚糞、牛糞の $\delta^{15}N$ 値は高く、これらの連用によって土壌自体の $\delta^{15}N$ 値も高まっていることが推定される。

上で仮の基準値とした+５‰については、注意するべき点がある。施肥履歴が重要で、以前に多量の有機肥料、あるいは逆に多量の化学肥料が施用されていた場合には、当作の肥料にかかわらず、土壌中の残効の窒素の $\delta^{15}N$ 値が生産物の $\delta^{15}N$ 値に反映される可能性が高くなる。また、マメ科の作物残渣が鋤込まれた場合にも注意が必要である。生物的窒素固定では同位体分別がないため $\delta^{15}N$ 値は 0 に近くなり、化学肥料を施用しなくても土壌窒素の $\delta^{15}N$ 値が低下することが考えられる。今後、より明確な規準を策定するために、有機物の種類や施肥法と $\delta^{15}N$ 値との関係を明らかにする研究が必要である。

(ｲ) 各地で生産された有機、無機栽培野菜の $\delta^{15}N$ 値の比較

市場流通野菜では、有機農産物表示ありの野菜の80％以上が $\delta^{15}N$ 値+４‰以上であり、$\delta^{15}N$ 値の高いことが示された。しかし、有機農産物表示であって $\delta^{15}N$ 値が低い野菜もあり、その理由としては、施用有機物が $\delta^{15}N$ 値の低いものであったこと、施肥履歴により土壌中に $\delta^{15}N$ 値の低い窒素分が蓄積していたこと、等が考えられる。その他、過失や故意により化学肥料が施用された可能性もある。有機農産物表示のない野菜でも45％のものは+4.0‰以上の高い $\delta^{15}N$ 値を示しており、その理由としては、化学肥料の他に家畜糞堆肥等の有機肥料も相当量施用して栽培されたことが推定される。

民間、公立研究所において栽培された野菜では、有機物施用区の野菜ではほとんどすべて（97.6％）が+4.0‰以上の $\delta^{15}N$ 値を示した。市場流通野菜と比較して肥培管理が厳密であったために、より明確な結果になったものと考えられる。

以上の結果を総合すると、$\delta^{15}N$ 値を有機農産物の真偽の判断材料のひとつに利用することが可能であり、$\delta^{15}N$ 値で+4.0‰が基準値としてできる可能性が示唆されたといえる。

(ｳ) イチゴの $\delta^{15}N$ 値に及ぼす肥料および土壌窒素の影響

イチゴ果実の $\delta^{15}N$ 値は肥料の $\delta^{15}N$ 値を反映することが示された。$\delta^{15}N$ 値の高い有機肥料を施用した区では、いずれの土壌でもイチゴは高い $\delta^{15}N$ 値を示し、$\delta^{15}N$ 値の低い化学肥料を施用した区ではいずれの土壌でもイチゴは低い $\delta^{15}N$ 値を示した。施肥窒素の依存率を $\delta^{15}N$ 値の 2 ソースモデルを用いて推定すると、化学肥料区では、肥料から植物体を構成する窒素の83±22％を、有機肥料区では肥料から植物体を構成する窒素の70±38％をそれぞれ吸収していると推定された（平均値±標準偏差）。両区とも植物体を構成するかなりの割合の窒素を肥料から吸収していることを示す結果である。このことは、$\delta^{15}N$ 値を用いた施肥履歴の判別が可能であることを示している。

一方、無肥料栽培では植物体は土壌窒素を吸収するため、植物体の $\delta^{15}N$ 値は土壌窒素の $\delta^{15}N$ 値に大きく影響を受けることが示された。なお、今回の試験では、土壌の $\delta^{15}N$ 値として土壌全窒素のその値を採っており、それは作物に吸収されない難分解性の画分も含むものである。植物に利用されやすいリン酸緩衝液抽出の窒素画分の $\delta^{15}N$ 値を採れば、その値とイチゴ果実の $\delta^{15}N$ 値とはより高い相関が得られるものと推定される。

(ｴ) トマトの $\delta^{15}N$ 値に及ぼす肥料および土壌窒素の影響についての各地での比較試験

果実の $\delta^{15}N$ 値は、多くは有機肥料区が化学肥料区よりも高かったが、北海道や熊本では、判別の困難な事例も認められた。ポットや隔離床試験では根域が制限されているため、土壌窒素からの影響が少なく、肥料の影響が明確に現れたが、$\delta^{15}N$ 値を用いた判別技術について新たな課題が生じたことになる。

これらの適応限界を突破するために、植物の$\delta^{15}N$値を規定しているのは土壌中のどの窒素画分なのかを明らかにして、根域が制限されない場合での施肥履歴の判別に資する知見を得る必要がある。

オ　今後の課題

有機物を施肥した農産物かどうかの判別方法については、本課題の一連の研究により、基準となる値を提示できた。今後は、施肥履歴全般についても推定ができるシステムを構築する必要がある。現段階では、農産物の$\delta^{15}N$値は、有機肥料（牛糞堆肥など充分発酵が進んだもの、土耕）＞有機肥料（なたねかすなど発酵していないもの、土耕）＞化学肥料（土耕）＞無機養液土耕（土耕）＞養液栽培（水耕）という序列になるという知見を得ている。今後、このような施肥履歴全般についての結果を集積し、一般に使用されるように判別ソフトウエアも開発する必要がある。

さらに、開発した窒素安定同位体比の指標と従来まで用いられてきた微量元素による原産地判別に関する判別指標を複合的に活用した新たな指標およびソフトウエアの開発により、さらなる高度施肥履歴・原産地の偽装判別を可能とする必要がある。

これらの履歴に関する科学的な情報は、消費者が農産物を選択するための情報として活用されるよう、これらの考え方等を普及していく必要がある。

カ　要　約

(ｱ) 有機JAS認証野菜と通常栽培野菜の$\delta^{15}N$値の比較

5種類の野菜（トマト、キュウリ、ナス、シシトウ、カボチャ）の、有機JAS認証野菜と通常栽培野菜の$\delta^{15}N$値を比較した。有機JAS認証野菜の$\delta^{15}N$値は+6～+10‰の間の高い値をとったのに対して、通常栽培野菜では-0.3～+4.05‰の間の低い値をとった。おおむね+5‰を境として、有機JSA認証野菜はこれより高く、通常栽培野菜はこれより低いことが示された。

(ｲ) 各地で生産された有機、無機栽培野菜の$\delta^{15}N$値の比較

各地で生産された市場流通野菜106点、および民間、公立研究所で有機、無機栽培された野菜129点を収集して、$\delta^{15}N$値を分析した。市場流通野菜では、有機農産物表示ありの野菜の$\delta^{15}N$値は、同表示なしの野菜よりも高い傾向が認められ、表示ありの野菜の80.4%が+4.0‰以上の値を示し、一方同表示なしの野菜は+4.0‰以上のものは45%だけであった。民間、公立研究所において栽培された野菜では、有機物施用区の野菜の$\delta^{15}N$値は、化学肥料施用区の野菜のそれよりも高い傾向が認められ、有機物施用区の野菜の97.6%が+4.0‰以上の値を示したのに対して、化学肥料施用区の野菜ではその割合は32.2%だけであった。

(ｳ) イチゴの$\delta^{15}N$値に及ぼす肥料および土壌窒素の影響

国内各地の7種類の土壌を用い、有機肥料（牛糞鶏糞コンポスト）または化学肥料を施用してイチゴを栽培し、果実の$\delta^{15}N$値を調べた。果実の$\delta^{15}N$値は、化学肥料区では-2.8～+1.7‰の範囲に入り、化学肥料の$\delta^{15}N$値-1.6‰の付近に分散していた。有機肥料区では+6.0～+11.3‰の範囲にあり、有機肥料の$\delta^{15}N$値+9.9‰の付近に分散していた。無肥料区では果実の$\delta^{15}N$値は土壌の$\delta^{15}N$値と相関が高かった。このように、イチゴの$\delta^{15}N$値は吸収した窒素の$\delta^{15}N$値を反映していた。

(ｴ) トマトの$\delta^{15}N$値に及ぼす肥料および土壌窒素の影響についての各地での比較試験

11道県の試験研究機関で、同一の有機あるいは化学肥料を施用して、極力同一条件でトマトを栽培し、果実の$\delta^{15}N$値を分析した。その結果、果実の$\delta^{15}N$値は有機肥料区で高く、化学肥料区では低くなる傾向が認められたが、土壌の$\delta^{15}N$値の影響が大きいことが示された。本試験のように、施肥量が少なく、前作の施肥の影響を受けやすい条件では、$\delta^{15}N$値による施肥判別が難しくなることが示唆された。

キ　引用文献

中野明正・上原洋一・渡邊　功　2002. 有機農産物認証を受けた果菜類の$\delta^{15}N$値. 日本土壌肥料学雑誌. 73:307-309

中野明正・上原洋一 2004. 有機肥料で栽培した野菜と化学肥料で栽培した野菜とを判別する基準としての窒素安定同位体比の適用. 野菜茶業研究所研究報告. 3. 119-128

中野明正・上原洋一 2006. イチゴの$\delta^{15}N$値に及ぼす肥料および土壌窒素の影響. 野菜茶業研究所研究報告. 5. 7-13

研究担当者（中野明正*、上原洋一）

14　果実加工製品における品種判別の検証

ア　研究目的

ナシ、モモ、リンゴ、オウトウ、スモモ、ウメ、アンズ、ビワなど多数の樹種がバラ科に属しており、日本の果樹生産の約半分を占める。生食用および加工用果実として非常に重要である。これらの果樹類では、果実形態での識別が困難な場合が多く、果樹生産や販売、研究に従事する専門職でも品種判別は困難である。また、その果実加工品は、缶詰、乾燥果実、ジュース、ジャムなど多岐に渡っているが、果実加工品での DNA 品種判別技術が確立していなかったため、加工原料品種の偽装表示や原産国の偽装が大いに危惧されている。本課題では、これらの果樹において、信頼度が高くさらに果実加工品のDNA品種判別に適したDNAマーカーを作成するとともに、ナシ、リンゴなどの果実加工品からの DNA 抽出方法の確立と DNA 品種判別の検証を行う。

イ　研究方法

(ｱ) モモ、ナシのゲノム DNA から作成した濃縮ライブラリーおよび cDNA ライブラリーから反復配列を持つクローンを選び、SSR マーカー（Simple Sequence Repeat、単純反復配列）を作成した。次に、短いDNA断片を増幅するSSRプライマーをデザインもしくは選抜し、果実加工品での DNA 鑑定に適する SSR マーカーへの改良を行った。また、葉緑体 DNA 配列に存在する反復配列を利用して、SSR マーカーを作成し、モモを始めとするサクラ属果樹の種判別に利用可能かどうかを検証した。

(ｲ) モモ、ナシ、リンゴで開発した SSR マーカーを用いて、ナシ、モモ、リンゴ、オウトウ、スモモ、ウメ、アンズ、ビワの品種判別を行った。一方のプライマーの 5’端に蛍光ラベル（Fam or Vic or Ned）したものを用いてPCRを行い、得られたPCR産物を、蛍光 DNA シークエンサー（ABI、PRISM 377もしくは 3100 Genetic Analyzer）で分離・検出を行い、GeneScan ソフトウエアを用いて解析を行った。

(ｳ) ナシの生果実、乾燥果実、缶詰、ジュースから、ゲノム DNA を抽出した。DNA 抽出には、Genomic-tip 20/G カラムと G2 バッファー（キアゲン社）、DNeasy Plant Mini Kit（キアゲン社）、Nucleon Phytopure Plant DNA Extraction Kit（アマシャムファルマシア社）、改変 CTAB 法の 4 種類の抽出方法を試みた。SSR マーカーを用いてフラグメント解析を行い、果実加工品で DNA 鑑定が可能かどうかの検証を行った。

ウ　研究結果

(ｱ) SSR マーカーの開発

モモ由来の濃縮ゲノムライブラリーから51種類、cDNA クローンから18種類など合計76種類の SSR マーカーを開発した（Yamamoto et al. 2002c、木村ら 2003）。品種判別に有効であった17種類については、加工品分析用に適する80-130bp の DNA 断片を増幅するプライマーをデザインし改良した。ナシでは、濃縮ゲノムライブラリー等から101種類の SSR マーカーを開発した（Yamamoto et al. 2002a, b）。うち、13種類が加工品分析に利用できることを検証した。リンゴでは、既存の74種類の SSR マーカーのうち加工品分析に適した16種類を選定・検証した。

ニホンスモモ品種「ソルダム」の葉緑体 DNA 約 4,300bp から反復配列を含む領域を11ケ所同定した（Ohta et al. 2005）。反復配列領域を増幅する SSR マーカーを作成し、モモおよび近縁種合計17種について解析を行った結果、モモ、スモモ、ウメ、アンズ、オウトウ、アーモンドなど果樹の種判別が可能であった。また、ナシ葉緑体を判別する SNP マーカーも作成した（木村ら 2004）。

(ｲ) 果樹類の品種判別

開発した SSR マーカーが、ナシ、モモ、リンゴ、オウトウ、スモモ、ウメ、アンズ、ビワに適用可能であることを明らかにした。ナシ、リンゴ、ビワは同じバラ科ナシ亜科に属し、ナシ（リンゴ）の SSR マーカーが亜科内で利用可能であった。モモ、オウトウ、スモモ、ウメ、アンズは同じバラ科サクラ亜科（サクラ属）に属し、モモの SSR マーカーが亜科内で利用可能であった。これらの SSR マーカーを利用して、これらの果樹類で、枝変わりを除く主要経済栽培品種の識別が可能であることを明らかにした（表1214-1）。

ナシでは、種苗管理センターとの共同研究で、幸水、豊水、二十世紀、新高を始めとする主要経済栽培品種約100品種の品種判別・親子鑑定技術を確立し、データベースを作成した（Kimura et al. 2002、木村ら 2002、Kimura et al. 2003、山本ら 2004、山本ら 2005）。モモでは、福島果樹試との共同研究で、白鳳、あかつき、川中島白桃などの主要栽培品種の品種判別・親子鑑定技術を確立した（Yamamoto et al.

2003、山本ら 2003）。リンゴでは、岐阜大学との共同研究で、ふじ、つがる、王林など主要品種約80品種が判別可能であった（Kitahara et al. 2005a, b）。オウトウでは、山形農総研センターとの共同研究で、佐藤錦、ナポレオン、高砂、紅秀峰など約100品種の識別が可能となっている。特にオウトウでは、山形県農業総合研究センターが「DNA 分析によるおうとうの品種の識別」（http://www.hinsyu.maff.go.jp/）として DNA 品種判別方法とそのマニュアルを作成し、農林水産省品種登録ホームページで公開されている。現時点で、農林水産省でオーソライズされた DNA 品種判別マニュアルは、果樹類ではオウトウの一例のみである。

表1214-1　DNA 鑑定が可能となった主な樹種と主要品種

樹種名	主要品種名
ナシ[1]	幸水、豊水、二十世紀、新高、長十郎、あきづきなど約100品種
モモ[2]	白鳳、あかつき、川中島白桃、日川白鳳、清水白桃など約50品種
リンゴ[3]	ふじ、つがる、王林、ジョナゴールド、千秋、陸奥など約80品種
オウトウ[4]	佐藤錦、ナポレオン、高砂、紅秀峰、紅さやかなど約100品種
スモモ[5]	大石早生、ソルダム、太陽、サンタローザ約120品種
ウメ[6]	南高、白加賀、豊後、小梅など約40品種
アンズ	信州大実、ハーコット、アーリーオレンジなど約20品種
ビワ[7]	茂木、田中、長崎早生、楠、大房、房姫など約30品種

注）各樹種の品種識別は以下の研究機関との共同研究で行った。
[1]種苗管理センター、[2]福島果樹試、[3]岐阜大学、[4]山形農総研センター、[5]山梨果樹試、[6]和歌山農総技センター、[7]長崎果樹試および千葉農総研センター

(ｳ) 果実加工品の DNA 鑑定

生果実で 4 種類の DNA 抽出方法を検討した結果、全ての方法でサイズの長い良好な DNA が単離可能であった（Yamamoto et al. 2006）。なかでも、Genomic-tip 20/G カラムと G 2 バッファーを用いる方法で良好な結果が得られた。生果実からの DNA 抽出は、葉からの DNA 抽出と比較して収量が低く、数十分の一であった。SSR 分析では、すべてのマーカーで増幅バンドが得られ、葉からの DNA で得られたデータと同一であった。

乾燥果実、缶詰、ジュースなどナシの果実加工品からのゲノム DNA 抽出方法も同様で、Genomic-tip 20/G カラムと G 2 バッファーの方法で、最も良好な結果が得られた（Yamamoto et al. 2006）。乾燥果実では部分的に分解された DNA が抽出され、比較的長いサイズの DNA も観察された。SSR 分析では、すべてのマーカーで増幅バンドが得られ、材料品種がバートレットであると同定できた。缶詰やジュースでは100-400bp 程度の極く低分子に分解された DNA が抽出された。SSR 分析では、約150bp 以上の断片を増幅する SSR マーカーでは、増幅バンドは得られなかった（Yamamoto et al. 2006）。約150bp 以下の断片を増幅する SSR マーカー、すなわち加工品分析用に選定した SSR マーカーを利用することにより、DNA 鑑定が可能であった。なお、缶詰、ジュースとも表示どおりの品種の果実が使用されていた。

図1214-1　乾燥果実から抽出したDNA
右）用いた乾燥果実
左）抽出されたゲノムDNA

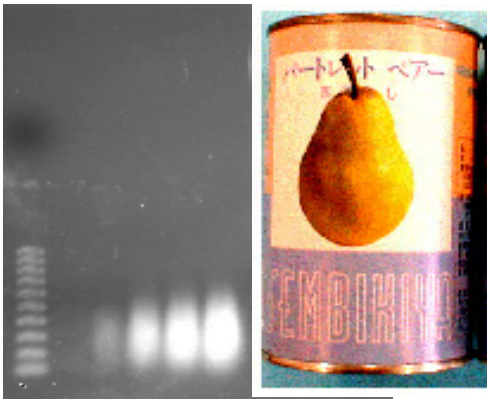


図1214-2　缶詰果実から抽出したDNA
右）用いた缶詰
左）抽出されたゲノムDNA
サイズマーカーは100-1,000bp

エ　考　察

(ア) 果樹類のSSRマーカーと品種判別

果樹類では、これまでに品種判別や親子判定等のDNA鑑定に利用可能な、信頼度の高い分子マーカーが少なかった。本課題により、ナシ、モモで信頼度の高いSSRマーカーを多数開発することができた。ナシやモモで開発したSSRマーカーが、同じバラ科に属する多くの樹種に適用可能であることから、ナシ、モモ、リンゴ、オウトウ、スモモ、ウメ、アンズ、ビワの品種判別技術を確立することができた。

(イ) 果実加工品のDNA鑑定

果実加工品の加工程度により、DNAの損傷程度・断片化程度に差異があることがわかった。加工程度の低い乾燥果実では部分的に分解されたDNAが抽出され、加工程度の高い缶詰やジュースでは100-400bp程度の極く低分子に分解されたDNAが抽出された。加工品に適するSSRマーカーを利用することにより、DNA鑑定が可能であった。しかしながら、加熱や薬品処理の条件、水溶液での保存期間や温度などの加工工程の詳細は、メーカーから公開されていない場合が多く、加工程度と抽出されるDNAの質との関係について、解明する必要がある。

オ　今後の課題

(ア) 果樹類の品種判別と果実加工品のDNA鑑定

主要落葉果樹（ナシ類、リンゴ、ビワ、スモモなど）について、SSRマーカーを用いたDNA品種判別技術とデータベースを完成させる。果実加工品については、果実の種類と多種多様な加工製品について、網羅的にDNA鑑定を進める必要がある。

(イ) 汎用的な自動分析システムの開発

次世代の品種判別技術の一つとして、SNPマーカー等による汎用的な自動分析システムの開発を試みる。

(ウ) 品種判別やDNA鑑定のマニュアル化

確立した品種判別やDNA鑑定の手法を登録品種の権利保護、果実や果実加工品の虚偽表示の防止、海賊版品種の摘発、食の信頼・安全の確保の場面で有効に利用していくために、マニュアル化を進める。

カ　要　約

(ア) 果樹類のSSRマーカーと品種判別

ナシ、モモなどで信頼度の高いSSRマーカーを多数開発するとともに、ナシ、モモ、リンゴ、オウトウ、スモモ、ウメ、アンズ、ビワの主要経済栽培品種の識別技術を確立した。

(イ) 果実加工品のDNA鑑定

乾燥果実、ジュース、缶詰などナシの果実加工品からのDNA抽出方法を確立し、さらにDNA鑑定が可能であることを明らかにした。

キ　引用文献

Kitahara, K. et al. 2005a. Parentage identification of eight apple cultivars by S-RNase analysis and simple sequence repeat markers. HortScience 40(2): 314-317.

Kitahara, K., et al. 2005b. Molecular characterization of apple cultivars in Japan by S-RNase analysis and SSR markers. J Am Soc Hortic Sci 1306: 885-892.

Kimura, T. et al. 2002. Identification of Asian pear varieties by SSR analysis. Breed Science 52: 115-121.

木村鉄也ら．2002．SSR マーカーを用いたナシの親子鑑定と親の推定．DNA 多型．10：48-51.

Kimura, T. et al. 2003. Parentage analysis in pear cultivars characterized by SSR markers. J Jpn Soc Hort Sci 72：182-189.

木村鉄也ら．2003．濃縮法による植物の SSR マーカーの開発．DNA 多型．11：72-75.

木村鉄也ら．2004．ナシ葉緑体 DNA trnL-trnF 遺伝子間領域の SNP マーカー．DNA 多型．12：48-50.

Ohta, S. et al. 2005. Chloroplast microsatellites in Prunus, Rosaceae. Mol Ecol Notes 5，837-840.

Yamamoto, T. et al. 2002a. Simple sequence repeats for genetic analysis in pear. Euphytica 124:129-137.

Yamamoto, T. et al. 2002b. Development of microsatellite markers in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). Mol Ecol Notes 2：14-16.

Yamamoto, T. et al. 2002c. Microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.)Batsch] derived from an enriched genomic and cDNA libraries. Mol Ecol Notes 2：298-301.

Yamamoto, T. et al. 2003. Parentage analysis in Japanese peaches using SSR markers. Breeding Science 53：35-40.

山本俊哉ら．2003．モモのゲノム解析―SSR マーカーの開発と品種識別―．DNA 多型．11：61-64.

山本俊哉ら．2004．セイヨウナシのグラフィカル遺伝子型解析の試み．DNA 多型．12：56-59.

山本俊哉ら．2005．分子マーカーによるナシ経済品種のデータベース作成．DNA 多型．13：68-72.

Yamamoto, T. et al. 2006. DNA Profiling of Fresh and Processed Fruits in Pear. Breeding Science 56: 165-171.

研究担当者（山本俊哉*、西谷千佳子）

15　モモ加工製品における品種判別の検証

ア　研究目的

モモは夏の季節感を誘う果実で、7月から9月まで、都市部で流通する代表的なものである。しかし、リンゴ、ブドウ、ナシ等の果実と比較して果実の外観は、品種間で明瞭な差異が少なく、果実による品種判別が最も困難な果樹である。

一方で、モモは産地と品種によるプレミアム性が極めて高い果実であるので、品種の不当表示の問題は今後深刻化する可能性が高く、科学的な品種判別法の確立が産地、流通、販売の現場サイドでは強く待望されている。

そこで、モモの主要経済品種について、SSR マーカーを用いて品種判別法を確立し、マーカーによる「カタログ」を整備する。また、果実加工品からの DNA 抽出と DNA 品種判別を試みる。

イ　研究方法

(ｱ) 国内で栽培されているモモ主要品種48種を供試した。供試材料の幼葉約0.1g および生果実0.5g から DNA 抽出キットである DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN 社)を用いて Genomic DNA を抽出し、分析に用いた。

(ｲ) SSR マーカーとして、果樹研究所および欧米で開発された SSR マーカー合計67種類について48品種の判別に供試した。

(ｳ) SSR 分析は片方のプライマーの 5’末端に蛍光ラベル（Fam or Tet or Hex）して PCR を行い、増幅産物を変性アクリルアミドゲルで DNA シーケンサー（Prism 377，PE-ABI）を用いて分画した。内部標準の蛍光ラベル DNA マーカー（GS350TAMRA）を指標に、GENESCAN 解析ソフト（PE-ABI）で解析した。

(ｴ) 果実加工品の効率的な DNA 抽出法および、加工品用に組み直した SSR マーカーを用い、果実加工品のフラグメント解析と品種判別を行った。供試した加工品は、シロップ漬け（5種類）、乾燥果実（1種類）、ジュース（4種類）を用いた。

ウ　研究結果

(ｱ) モモの品種判別

国内で栽培されているモモ品種の大部分を含む48種について、67種類の SSR マーカーにより品種判別を試みたところ、白鳳、あかつき、清水白桃などの主要品種を含み、枝変わりを除いた全ての品種を高

い信頼度で判別することができた。白鳳は旧神奈川県農事試験場で育成され、昭和８年命名された古い品種であるが、子としてあかつき、ゆうぞらなど重要な品種の親である。白鳳は種子親として白桃、花粉親として橘早生と報告があるため、白鳳と両親の遺伝子型を決定し、親子関係を調べた。白鳳の対立遺伝子型はSSRマーカーM1aで80/84で白桃から80が橘早生から84が遺伝していた（表1215-1）。同様に、M4c でも白桃と橘早生から一つずつ遺伝しており、矛盾無くバンドが遺伝していたため親であることが判明した。

また、白鳳の枝変わりとされている品種の判定を行った。枝変わりは、原品種と比較して遺伝子型が同じということで判定される。白鳳の枝変わりと報告のある長沢白鳳は、白鳳と遺伝子型が一致したため、枝変わりと判定された（表1215-2）。一方、同じく枝変わりと報告のある日川白鳳は、M4c、M6a の遺伝子座で一致していなかった（表1215-2）。さらに M4c ではどちらの対立遺伝子も遺伝していないことから親子関係でもないことが明らかになった。

（ｲ）遺伝子型データベースの作成

SSR マーカーによるカタログ化として、モモ遺伝子型データベースを作成した。データベースを利用することで、品種判別、親子判別、枝変わり判別が可能となり、品種登録時に記載された両親の正否を明らかにすることができた（図1215-1）。このデータベースにより、未知の品種が持ち込まれた場合、ゲノム DNA を抽出後、遺伝子型のデータを挿入して、検索することで品種の判別ができるため、迅速かつ的確な対応が可能となった。

表1215-1　白鳳の親子判別

育成品種	M1a	M4c	M6a	M12a
「白桃」	80 / 80	94 / 78	193 / 197	195 / 195
	↓	↓	↓	↓
「白鳳」	80 / 84	74 / 78	193 / 197	177 / 195
	↑	↑	↑	↑
「橘早生」	80 / 84	74 / 74	201 / 197	177 / 177

表1215-2　白鳳の枝変わりの判別

来歴　育成品種	M1a	M4c	M6a	M12a
枝変わり「長沢白鳳」	80 / 84	74 / 78	193 / 197	177 / 195
	↑　↑	↑　↑	↑　↑	↑　↑
原品種　「白鳳」	80 / 84	74 / 78	193 / 197	177 / 195
	↓　↓		↓	↓　↓
枝変わり「日川白鳳」	80 / 84	80 / 94	193 / 201	177 / 195

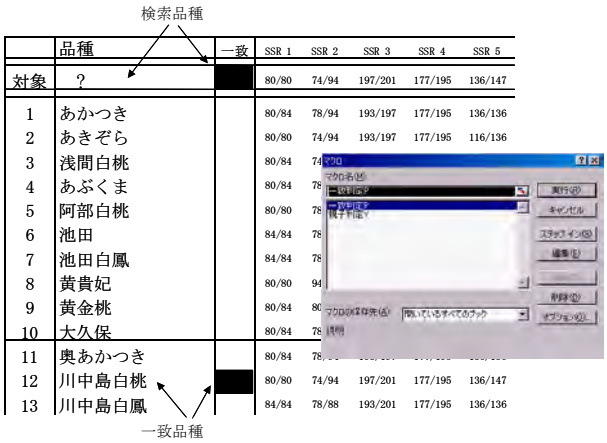


図1215-1　モモ遺伝子型データベースを利用した品種判別

1）数字は SSR マーカーの増幅サイズ

(ｳ) 果実加工品の分析

果実および果実加工品の品種判別をおこなうために、はじめに果実及び果実加工品からの最適なゲノムDNA抽出法の検討を行ったところ、現段階において最も効率的なDNA抽出法はGenomic Tip20であることが確認できた（図1215-2）。Genomic Tip20キットを用いて各種加工品からゲノムDNAの抽出を試みた結果、少量のサンプルでは抽出できないサンプルも見られたが、量を増やすことにより抽出することができた。加工品から抽出したDNAを品種判別に供したSSRマーカーで増幅を試みたが、検出サイズの大きいSSRマーカーでは増幅しにくい傾向が見られた。このため、加工品用にデザインし直し、このSSRマーカーが加工品の分析と品種判別に利用できることを確認した（表1215-3）。

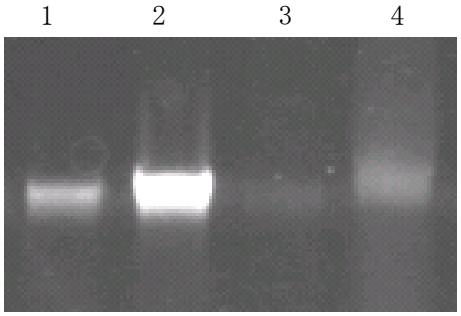


図1215-2 果実からのDNA抽出法の検討

1） 1．DNeasy(0.5g)、 2．Genomic Tip20(5.0g)、 3．Phytopure(0.1g)、 4．Phytopure(0.5g)
（抽出キット及びサンプル量）

(ｴ) 果実加工品の品種判別

生果実、シロップ漬け、ジュース及び乾燥果実のから品種判別が可能であるが、シロップ漬けCのSSRマーカーTM1aで見られるように、加工処理の程度で増幅されないものも存在した（表1215-3）。シロップ漬けの品種判別ではシロップ漬けAは清水白桃と遺伝子型が一致し、シロップ漬けBは大久保と遺伝子型が一致し、加工に用いられている品種を同定することができた。

一方、ジュースB（原材料記載：他県産白桃）において、モモは2倍体であるので、2つの遺伝子座が検出されるところが、TM4cとTMA013aで3つの遺伝子座が検出された（表1215-4）。ジュースBは、商品名表示に他県オリジナル品種Xと表記されていたが、複数の品種を混ぜていることがわかった。乾燥果実は、黄肉系統の遺伝子型がいくつか見られた。

表1215-3 加工品（シロップ漬け）のSSRマーカーを用いた品種判別

加工品（原材料）	TM1a	TM4c	TM6a	TM12a	TM15a	TMA006b	TMA007a	TMA013a	TMA014a
シロップ漬けA（白モモ）	83/87	83/97	85/99	107/126	89/89	107/107	113/136	75/75	93/97
シロップ漬けB（白モモ）	83/87	81/83	89/99	107/126	89/89	107/107	113/136	75/92	93/97
シロップ漬けC（白桃）	-/- z	-/-	-/-	-/-	89/89	-/-	-/-	75/92	93/97
清水白桃（葉）	83/87	83/97	85/99	107/126	89/89	107/107	113/136	75/75	93/97
大久保（葉）	83/87	81/83	89/99	107/126	89/89	107/107	113/136	75/92	93/97

加工品（原材料）	TMA015a	TMA017a	TMA023a	TMA024a	TMA027a	TMA030a	TMA031a	TMA035a
シロップ漬けA（白モモ）	98/105	112/124	106/115	91/91	97/136	80/82	129/137	87/99
シロップ漬けB（白モモ）	98/105	112/124	94/117	91/91	91/105	80/82	129/129	87/99
シロップ漬けC（白桃）	98/105	-/-	94/117	91/-	91/105	80/82	-/-	101/-
清水白桃（葉）	98/105	112/124	106/115	91/91	97/136	80/82	129/137	87/99
大久保（葉）	98/105	112/124	94/117	91/91	91/105	80/82	129/129	87/99

1）z：ーは増幅なし

表1215-4　葉および加工品からの SSR マーカーを用いた品種判別

加工品（原材料）	TM1a	TM4c	TM6a	TM12a	TM15a	TMA006b	TMA007a	TMA013a	TMA014a
ジュースA（白桃）	83/87	81/97	85/89	107/126	89/89	107/107	113/136	75/92	93/97
ジュースB（他県産白桃）[y]	83/87	77/81/97	85/89	107/126	69/89	107/107	113/136	75/89/92	93/97
乾燥果実（白もも）	83/87	83/91	99/-[z]	107/-	69/89	107/107	113/124	75/75	78/93

加工品（原材料）	TMA015a	TMA017a	TMA023a	TMA024a	TMA027a	TMA030a	TMA031a	TMA035a
ジュースA（白桃）	98/98	112/112	94/115	91/-	91/105	82/82	129/137	87/99
ジュースB（他県産白桃）	98/105	112/124	94/115	91/91	-/-	82/82	129/137	87/99
乾燥果実（白もも）	98/105	124/124	94/94	79/89	89/138	82/82	129/137	87/-

1）z：－は増幅なし
2）y：商品名表示に他県オリジナル品種 X と表記

エ　考　察

(ア) モモに限らず、果樹においては品種識別が困難であった。それは、葉や枝、果実など外見から品種判別が難しいこと。果実などの形質をみて判定するためにモモでは初成りまで、最低 3 年以上かかり、長い時間が必要であること。また、樹齢やその年の気象、生産者の栽培法により、収穫期や果実形質が大きく変わってしまうこと。これらの理由が品種識別を難しくしていた。しかし、本研究により、日本の栽培モモ品種について SSR マーカーを用いることで品種識別をすることができ、従来の方法と組み合わせることにより、より信頼性・精度の高い品種識別が可能となると推察された。ただし、モモの品種判別において、枝変わり品種は、使用した SSR マーカーの遺伝子型が枝変わり原品種と同一であり、かつ果実品質が原品種と明らかに異なっている場合に枝変わり品種として判別が可能であると推察された。

(イ) モモの加工品として主に販売されている、シラップ漬け、ジュース、乾燥果実からの品種判別をすることができた。しかし、加工品の DNA は短い断片しか抽出することができず、検出サイズの大きい SSR マーカーでは増幅が難しかった。また、加工処理の程度で DNA は抽出することができたが、増幅されないものも認められた。以上のことから、加工処理段階の加熱、加圧や糖の付加により、加工品中の DNA が損傷を受けていると推察された。

オ　今後の課題

(ア) 加工処理の違いによる品種判別の可否について分類する必要がある。

カ　要　約

(ア) 国内で栽培されているモモ品種48種類と67種類の SSR マーカーを用いて品種判別を行い、供試した品種を判別することができた。これを基に、SSR マーカーをカタログ化し、モモ遺伝子型データベースを作成した。

(イ) 果実加工品の品種判別を容易にするために、加工品から効率的に DNA を抽出する手法を確立すると同時に、デザインし直した SSR マーカーが加工品の分析に利用できることを確認した。本方法を用い、シロップ漬けやジュース等の加工品から品種判別をすることができた。

キ　引用文献

小野勇治ら 2003a. SSR マーカーによるモモの品種識別と親子鑑定. 園学雑. 72(別 1):14

小野勇治ら 2003b. モモのグラフ遺伝子型データベースの構築 その 1 SSR マーカーによるグラフ遺伝子型の解析. 園学雑. 72(別 2):253

小野勇治ら 2004a. SSR マーカーによるモモの品種識別と親子鑑定 その 2 育成品種・系統の解析. 園学雑. 73（別 1）:182

小野勇治ら 2004b. モモ品種の SSR 遺伝子型による果実および花形質特性の判別分析. 園学雑. 73（別 2）:548

小野勇治ら　2005. モモのグラフ遺伝子型データベースの構築 その 2 果実 pH に関連した SSR マーカーによるグラフ遺伝子型の解析. 園学雑. 74（別 1）:185

大橋義孝ら　2005. モモ品種の果実および花形質特性の判別マーカーの取得と実生集団での検証. H17 果樹バイテク研究会抄録集.（果樹研究所編集）

佐藤守ら　　2005. 福島県における果樹育種の現状とマーカー育種に期待するもの. H17果樹バイテク研究会抄録集.（果樹研究所編集）

研究担当者(大橋義孝*、木幡栄子、小野勇治、佐藤守)

16　カンキツ加工製品における品種判別の検証

ア　研究目的

カンキツはウンシュウミカン、ポンカン、オレンジ、グレープフルーツ、レモン、ブンタン、キンカンなど、多様な品種群の総称であり、国内だけでなく世界的にも生産量が最も多い果樹である。主要生産国はブラジル、中国、アメリカ、スペイン、メキシコ、インド、イラン、日本などである（FAO、2004年統計）。果実は生果実だけでなく、ジュース、缶詰、ジャムやマーマレード、ドライフルーツなどの加工製品としても利用される。特有の芳香を有することから乾燥した果皮は調味料や漢方薬の原料としても利用されるほか、香料原料としても利用される。これらの生産物、加工物は世界的な規模で流通しているが、それにともない、不当表示や、育成品種の国外への持ち出しなどが懸念されている。そのため、加工製品に含まれる品種の妥当性を科学的に検証するための手法が求められてきた。

本研究では加工製品中に含まれる DNA を利用し、品種に対する特異性の高い DNA マーカーを利用した品種判別法の開発に取り組んだ。加工品として、流通量の多い果汁と果皮を主たる対象とし、それらの DNA 抽出法の検討と得られた DNA の特性の解明、および、加工品に適した品種判別法とそれに合わせた DNA マーカーの開発と検証を行った。

イ　研究方法

(ｱ) カンキツ品種判別マーカーの開発

a　カンキツの CAPS マーカー約400について、果樹研究所で育成された18品種（南香、早香、サザンレッド、はれやか、ミホコール、陽光、はるみ、あまか、はれひめ、不知火、清見、清峰、津之香、ありあけ、天草、朱見、西之香、せとか）とそれらの親品種を対象として、葉から抽出した DNA を用いて多型性を評価した。

b　選抜した CAPS マーカーについて、藤井らの開発した‘MinimalMarker’ソフトウェアを用いて最少マーカーセットを求めた。

(ｲ) カンキツ果実および加工製品からの DNA 抽出法の検討

a　生果皮からの全 DNA 抽出には、DNA purification system for Food （Promega 社）を使用した。抽出した DNA は Hoefer DyNA Quant 200（アマシャムバイオサイエンス社）を用いて定量した。乾燥果皮のモデル実験は、送風乾燥機を用いて生果皮を一定の温度と時間で乾燥させたものから、生果皮と同様の方法で DNA を抽出し、定量した。得られた DNA を鋳型として、増幅産物長の異なる複数の CAPS マーカーを用いた PCR 反応を行い、増幅性を検討した。

b　市販の果汁からの DNA 抽出は、果汁にイソプロパノールを加えて得られる沈殿を、genomic-tip （QIAGEN 社）を用いて純化し、定量した。得られた DNA について、果皮と同様に CAPS マーカーを用いて増幅性を検討した。

(ｳ) カンキツ加工品に適した品種判別用 DNA マーカーの開発

a　品種判別に利用できる CAPS マーカーを使い、各品種での増幅産物を調製し、塩基配列を決定した。品種間で配列を比較し、一塩基多型を検出した。その結果を元に、100bp 程度を増幅する SNP 検出のためのプライマーセットを開発し、品種間での多型を検証した。実験には TaqMan によるアレル判別システム（ABI PRISM7000）を用いた。

b　日本、アメリカ、中国で購入した市販の乾燥果皮を使い、TaqMan システムにより作製した SNP マーカーの判別能力を検証した。

ウ　研究結果

(ｱ) カンキツ品種判別マーカーの開発

a　カンキツの品種判別マーカーとして、CAPS マーカーを用いた。これは特定の DNA 断片を PCR 法により増幅し、それを制限酵素で消化した際の DNA 断片の鎖長の違い（DNA 多型）を利用する判別法である（図1216-1）。PCR に用いるプライマー配列をカンキツの EST 情報などを利用して設計することで、RAPD 法と比較して再現性に優れ、共優性マーカーの得られる頻度が高く、簡易な分析方法でも高い判別能力を有する（図1216-2）。これまでに開発したカンキツ CAPS マーカーについて、果樹研究所育成の18品種について多型性を評価した結果、81の CAPS マーカーをこれらの品種間で多型を示すものとして選抜し、データベース化した。品種間でのマーカーの一致度は最大で87％であったが、大部分の品種間では一致度は70％以下であった。親の組み合わせがよく似ている「はるみ」と「不知火」間のマーカーの一致度は53％であり、十分な判別能力を有してい

ることが明らかとなった。以上のことから、今回開発した CAPS マーカーを用いることでこれら育成品種の判別が可能である。

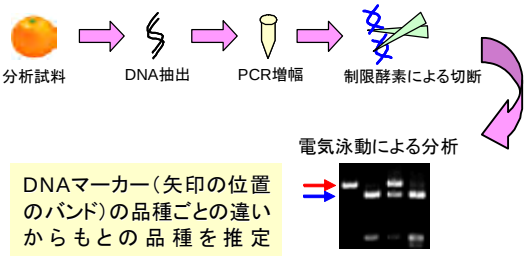


図1216-1　CAPS 法を利用したカンキツの品種判別法の原理

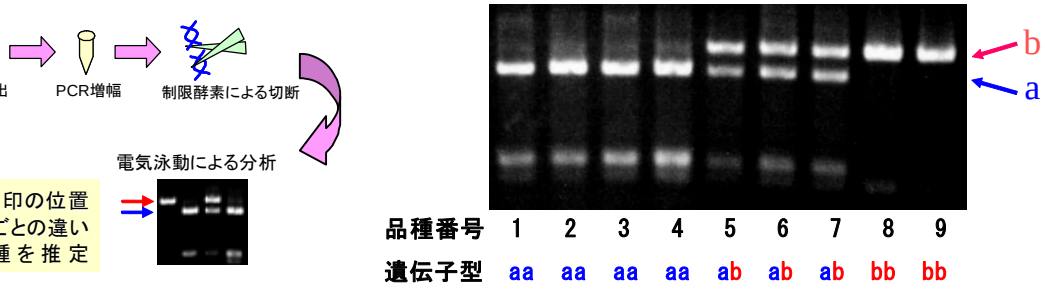


図1216-2　CAPS 法での品種判別の例

b　今回開発したマーカーについて、品種とマーカーの多様な組み合わせの中から品種判別のための最少限のマーカーセットを求めるソフトウェア‘MinimalMarker’を用いて最少マーカーセットを求めたところ、対象とした18のカンキツ育成品種は 5 つの CAPS マーカーだけで判別可能であることが示された。

(ｲ) カンキツ果実および加工製品からの DNA 抽出法の検討

a　カンキツの果実、果汁ならびに果実加工品からの DNA 抽出法と、得られた DNA での品種判定について評価した。マグネットビーズを利用する市販の DNA 抽出キットを用いて生果実から得られた DNA は十分な鎖長と純度を有しており（図1216-3）、CAPS マーカーによる品種判別が可能であった。一方、果皮を乾燥させるモデル実験から、乾燥時の温度と乾燥時間に比例して DNA の収量が低下し、150℃で 1 時間を越えると DNA 抽出量は急速に低下し、また得られる DNA の平均鎖長も短くなった。その結果、長い DNA 断片を増幅する CAPS 分析では再現性が低下し、果皮の乾燥工程で一般に用いられる200℃近辺で乾燥した果皮から抽出した DNA を対象とする場合、増幅産物の鎖長に留意したプライマーを設計する必要があった。

b　市販のカンキツ果実飲料からの DNA 抽出法を検討し、市販の DNA 純化用カラムを用いるプロトコルを開発した。この方法で抽出された DNA は、乾燥果皮の場合と同様、長鎖の DNA を増幅する PCR 反応では再現性の低下が認められ、増幅産物の鎖長を 400bp 以下とすることが必要であった（図1216-4）。なお、市販果汁を対象とする分析の問題として、清澄果汁からはPCR分析可能なDNAが得られていない。

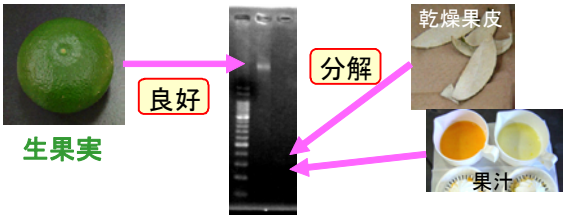


図1216-3　果実とその加工品から抽出した DNA の鎖長の変化

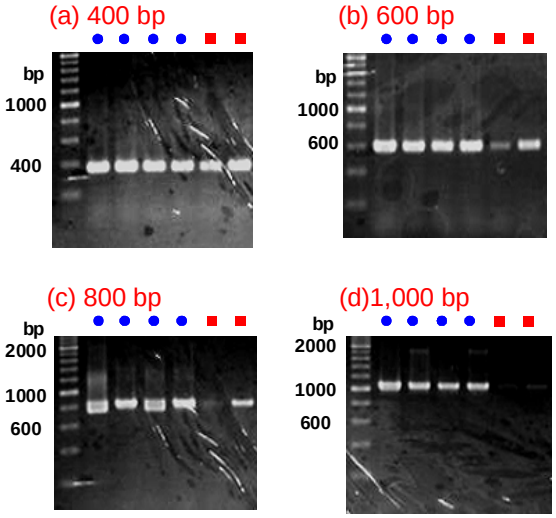


図1216-4　果汁から抽出した DNA を鋳型とする PCR 分析の例

鎖長の異なる産物を増幅させるプライマーを用いて PCR 反応を行った。青丸は生葉、果肉から抽出した DNA、赤丸はウンシュウミカン、オレンジ果汁から抽出した DNA。

増幅産物の鎖長は(a) 400 bp、(b) 600 bp、(c) 800 bp、(d) 1,000 bp。

c　上記の乾燥果皮、および果汁からの DNA 抽出方法については種苗管理センターの協力を得てプロ

トコル化した。

(ｳ) カンキツ加工品に適した品種判別用 DNA マーカーの開発

a　乾燥果皮や果汁などから抽出される DNA で品種判別を行う場合、増幅産物の鎖長を400bp 以下とする必要があると考えられた。そこで100bp 程度の短い領域で品種特異的な多型を得るために品種間の一塩基多型を検索してデータベース化し、その結果をもとに一塩基多型を検出するためのマーカーセットを 8 種類設計した（図1216-5）。育成品種にこれらの親品種を加えた23品種について、設計した SNP 判別マーカーによる品種判別を試みたところ、23品種のすべての組み合わせで用いた 8 種類のマーカーの 1 つ以上が異なっており、品種判別が可能であった。

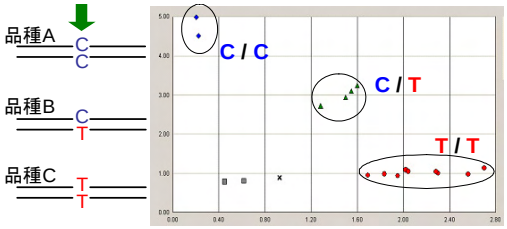


図 1216-5　DNA マーカーによる一塩基多型(SNP)の検出例
a:各品種に特徴的な、DNA の1つの違い（SNP：矢印の位置）
b:一塩基の違いの判別結果。分析により、各塩基の組合せは2次元の特定の位置に分布

b　作製した SNP マーカーを用いて市販されているウンシュウミカン果皮の品種判別を試みた。 8 検体のうち、増幅シグナルの得られなかった一つを除き、すべて表示通りの品種であることを確認することができた。

エ　考　察

開発された CAPS マーカーは解析対象となる可能性のある品種数に対して十分な数が用意されており、また、特定の組み合わせについて利用可能なマーカーも数多く準備されていることから、今後育成される品種についても容易に対応できると考えられる。また‘MinimalMarker’により最少マーカーを選抜することで、分析コストの削減と作業時間の短縮を図ることが出来る。このソフトウェアはカンキツ以外にさまざまな品種、マーカーの組み合わせでも結果を求めることが可能であり、今後各種の品種判定への有効利用が期待される。また、DNA の分解が進んだ加工品由来の DNA についても、SNP を利用することで品種判別が可能であることを示した。今後、利用可能な SNP マーカーを増やすことで、判別可能な品種と加工品の範囲を拡充することが可能である。

オ　今後の課題

清澄果汁や混合果汁中に含まれる品種の判別、および、混合割合の推定について、定量的な解析法を開発する必要がある。SNP マーカーの利用は信頼性の高い分析方法であるが、分析コストは高額であり、より低コストで作業時間の短い分析法を開発する必要がある。今回開発したマーカー等は育成品種を対象としているが、カンキツ品種の多くを占める枝変わり等に由来する品種は判別することが出来ない。今後、これら枝変わり由来の品種についても判別を可能とする手法とマーカーの開発が望まれる。

カ　要　約

カンキツ品種判別マーカーを開発し、カンキツ果実および加工製品からの DNA 抽出法の検討し、乾燥果皮及び果汁からの抽出方法については種苗管理センターの協力を得てプロトコル化した。さらに、カンキツ加工品に適した品種判別用 DNA マーカーを開発した。

キ　引用文献

野村和希・清水徳朗・藤井浩・島田武彦・遠藤朋子・木村鉄也・山本俊哉・大村三男 2006. カンキツ乾燥果皮及び果汁からの DNA 抽出法の改良と Taqman プローブによる品種判別. 園学雑 75（別 1 ）:293.

藤井浩・池谷祐幸・緒方達志・島田武彦・遠藤朋子・清水徳朗・大村三男 2005. 共優性マーカーと優性マーカーの混在下での品種判別のための最少マーカーセット選択法. 園学雑. 74（別 2 ）: 281.

研究担当者（清水徳朗*）

17　果実加工製品における品種判別のマニュアル化と実証

ア　研究目的

種苗管理センターでは種苗法に基づいた新品種育成者権の保護のための業務を行っている。新品種育成者権保護のため、種苗・収穫物や加工品での品種判別技術が求められている。これまで、果樹研究所と共同でナシ由来のSSR(simple sequence repeat)マーカーを開発し、ナシの葉及び果実からの品種判別が可能であること等を明らかにしてきた。

本課題では、農研機構果樹研究所、福島県果樹試験場と協力して、果樹での果実加工品の分析に関する操作マニュアルを作成するとともに、個別果実加工品のDNA鑑定の実証を行い、異なる実験室でも利用可能な高い精度の品種鑑定用マニュアルを完成させる。

イ　研究方法

(ｱ) 果樹の品種鑑定に関するこれまでの知見等から、モモ及び近縁種、ナシ、リンゴ、カンキツ各種果実加工品のDNA品種判別を行うための操作に関して共通する部分、分析試料取り扱い、基本操作（分析含む）、分析試薬、コンタミネーションについての操作マニュアルを作成する。

(ｲ) モモ及び近縁種、ナシ、リンゴ、カンキツの果実加工品である缶詰、ジュース、ジャム、ドライフルーツ等について作成した基本操作マニュアル等に従いDNA鑑定の実証を行い、更に、実証結果等に基づき作成した基本操作等マニュアルを改良・完成させる。

ウ　研究結果

(ｱ) モモ及び近縁種、ナシ、リンゴ、カンキツ各種果実加工品のDNA品種判別を行うための操作に関して共通する部分、分析試料取り扱い、実験器具類等の取り扱い及びDNA抽出等の基本操作、分析試薬の種類や調整、コンタミネーション防止についてのマニュアルを2種類（概要版と詳細版（図1217-1））を作成した。

(ｲ) 作成した基本操作等マニュアルに従いGenomic-tip 20/G（Qiagen社)を用いDNA抽出した結果、自然乾燥処理のリンゴチップスからは高分子のDNAが得られ、リンゴジュースやリンゴチップス（低温フライ処理）から得られたDNAは極低分子、やや低分子に分解していたが、DNA抽出は可能であった（図1217-2)。

(ｳ) 18種類のリンゴSSRマーカーを用い分析した結果、リンゴジュース及びリンゴチップスから得られたDNAを鋳型とした場合、いずれにおいても、約250bpの長さのDNA断片が増幅された。また、各SSR遺伝子座で得られた対立遺伝子の種類からリンゴチップスNo. 1（ラベル表示：陸奥)、 No. 2（ジョナゴールド）はラベルの表示通り「陸奥」、「ジョナゴールド」と同じ遺伝子型を示し、リンゴジュースNo. 3（ふじ）は「ふじ」から加工されたことがわかった（表1217-1)。

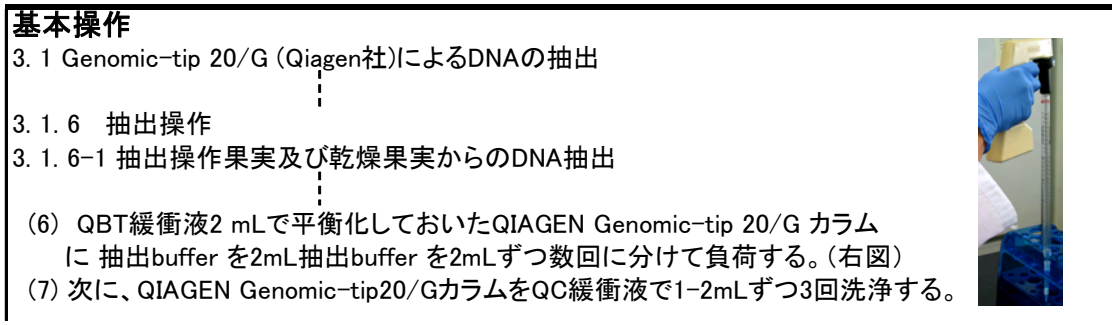


図1217-1　作成した基本操作マニュアル（詳細版）の例

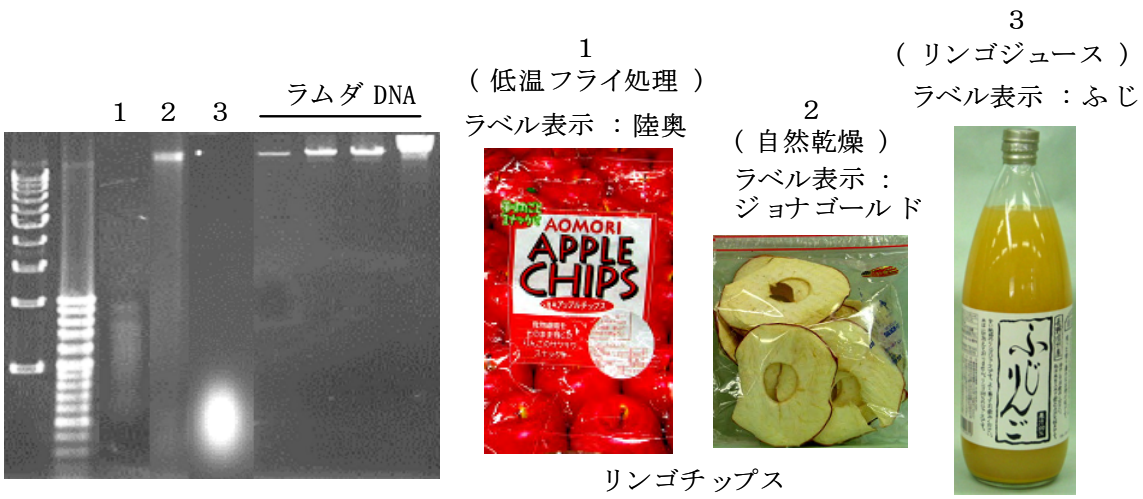


図1217-2　リンゴチップス（No. 1、2）とリンゴジュース（No. 3）から抽出した DNA

表1217-1　リンゴチップス及びリンゴジュースからの SSR マーカーを用いた品種同定

	SSRマーカーの種類					
	CH03a04	MS06c09	CH03b10	CH03d12	MS14h03	CH04d02
No. 1	112/117	98/112	108/112/125	110/119	119/123/135	119/131/145
No. 2	94/117	98/112	108/125	119/	119/123	119/131
No. 3	88/117	112/	101/112	110/119	119/123	117/119
陸奥	112/117	98/112	108/112/125	110/119	119/123/135	119/131/145
ジョナゴールド	94/117	98/112	108/125	119/	119/123	119/131
ふじ	88/117	112/	101/112	110/119	119/123	117/119

	SSRマーカーの種類					
	CH01g05	CH01f03b	CH02a10	CH01f07a	CH04f10	CH02c09
No. 1	137/143	145/177/183	152/158	172/193	192/250	240/254
No. 2	137/141/143	145/177	152/180	172/189/193	192/236	240/246/254
No. 3	137/141	177/185	152/158	172/201	198/250	－ / －
陸奥	137/143	145/177/183	152/158	172/193	192/250	240/254
ジョナゴールド	137/141/143	145/177	152/180	172/189/193	192/236	240/246/254
ふじ	137/141	177/185	152/158	172/201	198/250	230/242

－：増幅無し

エ　考　察

(ｱ) リンゴジュースや低温フライ処理のリンゴチップスから抽出された DNA は極低分子、やや低分子に分解されていた。加工品は製造過程で熱処理等加えられているため、抽出された DNA は低分子に分解されると示唆されている。しかしながら、作成した基本操作等マニュアルの抽出方法に従うことで DNA は抽出され、品種鑑定に用いることができた。このことから、基本操作等マニュアルの内容は適正であると考えられた。また、150bp 以下の長さを増幅する SSR マーカーをより多く用いることで果樹の果実加工品の品種判定は可能と考えられた。

オ　今後の課題

(ｱ) 果樹での果実加工品の生成過程、特に試薬、加熱処理等は業者により異なると考えられる。そのため、加工生成過程に応じた効率的な DNA 抽出方法の検討・確立を図る。

(ｲ) 抽出された DNA の分解が甚だしく、SSR マーカー解析できない場合に備えた DNA マーカー解析手法を確立させる。

(ｳ) 上記(ｱ)、(ｲ)の確立により、マニュアル化と実証を行い、異なるラボでも同一の結果が得られる、精度の高い品種判別技術を完成させ、更に生鮮果実を迅速に DNA 鑑定可能な技術開発を行う。

カ　要　約

(ア) 果実加工品の DNA 品種判別を行うための操作に関して共通する部分、分析試料取り扱い、実験器具類等の取り扱い、基本操作、分析試薬の種類や調整、コンタミネーション防止についてのを 2 種類(概要版と詳細版) を作成した。

(イ) 作成した基本操作等マニュアルに従い、リンゴチップス、リンゴジュースの品種鑑定を行い、加工に用いられた品種を同定することができた。また、実証により得られた内容を作成したマニュアル付加及び修正し、より精度の高いものにすることができた。

キ　引用文献

(ア) 木村鉄也、 小曽納雅則、 壽　和夫、 林　建樹、 伴　義之、 山本俊哉 (2003). ナシ果実及び加工品の DNA 分析 I. 生果実、乾燥果実、 缶詰からの DNA 抽出. 園芸学雑誌 第72巻 別(2) 252p.

(イ) 木村鉄也、林　建樹、伴　義之、山本俊哉 (2004). ナシ果実及び加工品の DNA 分析
II. ジュースからの DNA 抽出と品種の同定. 園芸学雑誌 第73巻 別(1) p173.

(ウ) 木村鉄也、小曽納雅則、林　建樹、伴　義之、山本俊哉 (2004). ナシ果実及び加工品の DNA 分析 III. SSR 分析による生果実、乾燥果実、缶詰からの品種同定. 育種学研究 第 6 巻 別(1)
102p. .

(エ) 木村鉄也、林　建樹、伴　義之、山本俊哉. (2004). ナシ葉緑体 DNA *trnL-trnF*
遺伝子間領域の SNP マーカー. DNA 多型 12: 48-50.

(オ) 木村鉄也、小曽納雅則、西谷千佳子、伴　義之、山本俊哉 (2006). SSR マーカーを用いたリンゴ加工品の DNA 鑑定. DNA 多型. 15:139-141

研究担当者 (木村鉄也*)

18　キノコ類の系統判別法の検証

ア　目的

育成者権の保護強化の観点から加工品も含め非 UPOV (食品品種保護国際条約) 加盟国の輸入きのこを効率良く水際検査する体系を作ることが行政的にも要望されている。本課題では、シイタケで品種間多型の顕著な IGS 領域の DNA シーケンスを決定し、情報をデータベース化し公開するとともに、各品種の IGS-DNA のバンクを作り標準指標 DNA をして整備することで、上記要望に寄与する。

イ　研究方法

(ア) 菌株　種苗登録品種62品種 (平成17年12月現在) を含むシイタケ市販品種140品種は、きのこ種菌会社から直接購入した。天然採集シイタケ菌株22菌株は、森林総合研究所に保存されている菌株を用いた。

(イ) 菌糸体からの DNA 調製

菌株は、2 %(w/v)マルトエキス液体培地を用いて 25℃で培養した。DNA は、培養した菌糸体を乳鉢に入れ液体窒素下で粉砕後、CTAB(hexadecyltrimethylammonium bromide) 法 (Zolan and Pukkila 1986) を用いて調製した。

(ウ) DNA シーケンス法

きのこの rDNA 領域の IGS(Intergenic Spacer) DNA シーケンスは、PCR 法で増殖した IGS DNA 断片を pGEM T-easy vector を用いて T/A cloning 後、Licor 社の LIC-4200L-2G DNA シーケンシングシステムで行った。

(エ) DNA 解析法

DNA のアライメント(alignment:整列)は、INRA のホームページ(http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html)の Multiple sequence alignment with hierarchical clustering (Corpet 1988)と DDBJ ホームページ(http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-e.html)の Clustal W プログラムを用いた。また、系統樹作成は、DDBJ ホームページの Clustal W プログラムで近隣接合法と木村の補正値を用いて行った。

ウ　結果

(ア) シイタケ品種の IGS1-DNA バンクの構築及びその塩基配列の決定

きのこ品種の絶対指標としてリボゾーム DNA (rDNA) 領域にある IGS1の DNA 塩基配列 (シーケンス) を用いるため、我が国の市販シイタケ品種を購入し、その培養菌糸体から調製した DNA を鋳型として IGS1を増幅し、IGS1-DNA バンクを構築するとともに、その DNA シーケンスを決定した。図1218-1は、登録品種62品種の IGS1-DNA シーケンスのアライメント(Alignment:整列)表示である。

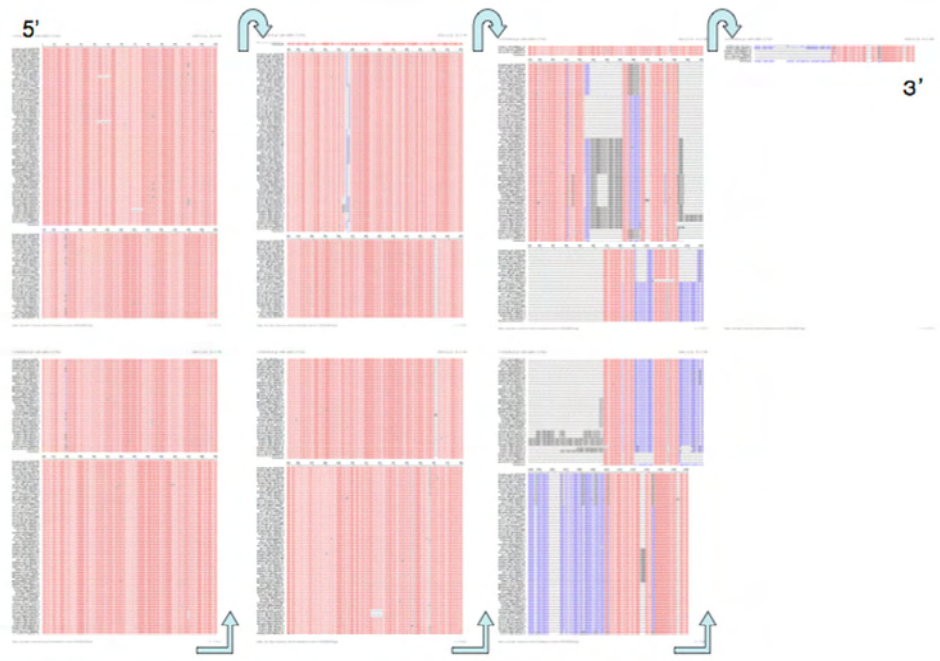


図 1218-1　シイタケ62登録品種のIGS1-DNAシーケンス

注）赤色は62品種が同一塩基であることを示し、灰色は塩基がないことを示す。
青、黒色は、部分的に同一な塩基があることを示す。

IGS1-DNA シーケンスの3'末端側を中心にシイタケ品種の絶対指標となるDNA配列の多型がみられた。このため、市販品種140品種のIGS1-DNAシーケンスを決定してDNA Data Bank of Japan（DDBJ）に登録した。この結果、我が国で育成され、かつ、現在流通しているシイタケ品種については、IGS1-DNAシーケンスが分かれば、世界中からインターネットで、誰でも、簡単に品種名を照合できるようになった。表1218-1は、市販シイタケ品種名とそのIGS1情報のDDBJ/EMBL/GenBank へのアクセション(Accession)番号を示す。

表1218-1. 日本の市販シイタケ品種名とその IGS1-DNA 塩基配列の DDBJ への ACCESSION 番号

	ACCESSION No. (DDBJ)	市販品種名	種菌会社名[1)]
1	AB251643	森 富富**[2)]	森産業株式会社 (Mori SangyoCo., LTD.)
2	AB251644		
3	AB251765		
4	AB251645	森 505*[3)]	
5	AB251646	森 活活**	
6	AB251647		
7	AB251648	森 だい次郎**	
8	AB251649		
9	AB251650	森 与一丸**	
10	AB251651	森 夏美**	
11	AB251652	森 252*	
12	AB251653	森 436*	
13	AB251654	森 清美**	
14	AB251655	森 ニュー 121	
15	AB251656	森 121	

16	AB251657	森 147*	
17	AB251658	森 Y763*	
18	AB251659	森 290*	
19	AB251660	森 Y602*	
20	AB251661	森 Y707*	
21	AB251662	森 440*	
22	AB251663	森 465	
23	AB251664	森 MM1	
24	AB251665		
25	AB251666	神子 50	(株)神子種菌研究所 (Kamiko Shukin Inst.)
26	AB251667	大貫 S-4	(有)大貫菌蕈 (Onukikinjin)
27	AB251668	大貫 S-3	
28	AB251669	大貫 S-1	
29	AB251670	大貫 S-117	
30	AB251671	大貫 S-103	
31	AB251672	カネボウ KB2001*	カネボウアグリテック株式会社 (Kanebou Agritech Corporation)
32	AB251673	富士種菌 F954	(株)富士種菌 (富士種菌 Co., LTD.)
33	AB251674	富士種菌 F937	
34	AB251675	富士種菌 F103	
35	AB251676	富士種菌 F306	
36	AB251677	富士種菌 F352	
37	AB251678	富士種菌 F373	
38	AB251679	富士種菌 F501	
39	AB251680	富士種菌 F312*	
40	AB251681	すその 360*	日本農林種菌株式会社 (Nihon nourinshukin Co., LTD)
41	AB251682	日農 300	
42	AB251683	日農 569	
43	AB251684	日農 600	
44	AB251685	日農 679	
45	AB251686	加川 KM-7	加川椎茸株式会社 (Kagawa shiitake Co. LTD.)
46	AB251687	加川 KM-5	
47	AB251688	加川 KM-3	
48	AB251689		
49	AB251690	加川 KM-2	
50	AB251691		
51	AB251692	加川 KM-1	
52	AB251693		
53	AB251694	東北 S-12*	(株)キノックス(Kinokkusu Corporation)
54	AB251695	キノックス KX-S033*	
55	AB251696	キノックス KX-S034*	
56	AB251697	キノックス KX-S035**	
57	AB251698	東北 S 29	
58	AB251699	東北 S 2	
59	AB251700	東北 S 10	
60	AB251701	東北 S 20	
61	AB251702	東北 S 24	
62	AB251703	東北 S 27	
63	AB251704		
64	AB251705	東北 S 32	
65	AB251706	北研 62*	(株)北研 (Hokken Co., LTD.)
66	AB251707	北研 68**	
67	AB251708	北研 71**	
68	AB251709	北研 600*	
69	AB251710	北研 603**	
70	AB251711	北研 606**	
71	AB251712	北研 607**	
72	AB251713	秋山 A-6	(株)秋山種菌研究所 (Akiyama Shukin)
73	AB251714	秋山 A-20	
74	AB251715	秋山 A-221*	

75	AB251716		
76	AB251717	秋山 A-500**	
77	AB251718		
78	AB251719		
79	AB251720	秋山 A-503*	
80	AB251721	秋山-A-526**	
81	AB251722	秋山-A-567*	
82	AB251723	秋山-A-580*	
83	AB251724	秋山-A-589**	
84	AB251725	秋山-A-800*	
85	AB251726	秋山-A-817**	
86	AB251727	菌興 101**	菌興椎茸協同組合 (Kinkou Shiitake Kyoudoukumiai)
87	AB251728	菌興 702**	
88	AB251729	菌興 115*	
89	AB251730	菌興 135*	
90	AB251731	菌興 141**	
91	AB251732	菌興 189*	
92	AB251733	菌興 241	
93	AB251734	菌興 245*	
94	AB251735	菌興 248**	
95	AB251736	菌興 357	
96	AB251737	菌興 368**	
97	AB251738	菌興 610*	
98	AB251739	菌興 690*	
99	AB251740	菌興 692**	
100	AB251741		
101	AB251742		
102	AB251743	菌興 695**	
103	AB251744	JMS 7L-5*	明治製菓株式会社(廃業) Meije Seika Kaisha departed from Mushroom breeding bussines in 2002
104	AB251745	JMS 5K-16**	
105	AB251746	明治 shin 908	
106	AB251747	明治 shin 904	
107	AB251748	明治 904	
108	AB251749	明治 908	
109	AB251750	JMS 7O-7	
110	AB251751	JMS 369	
111	AB251752	明治 1303w	
112	AB251753		
113	AB251754	JMS 5A-1*	明治製菓株式会社(廃業) Meije Seika Kaisha departed from Mushroom breeding bussines in 2002
114	AB251755	JMS 3V-58**	
115	AB251756	JMS 6V-1*	
116	AB251757	JMS 7H-3*	
117	AB251758	JMS 9K-3*	
118	AB251759	JMS 237**	
119	AB251760	JMS KV―92**	
120	AB251761	JMS 2H-5*	
121	AB251762	JMS 5K-23*	
122	AB251763	JMS 10K-5**	
123	AB251764		
124	AB251766	JMS 9O-5**	
125	AB251767		
126	AB251768		
127	AB251769	JMS 9K-4**	
128	AB251770		
129	AB251771	JMS 4M-10**	
130	AB251772		
131	AB251773	shizuoka K330*	(株)河村式椎茸研究所 (Kawamurashiki Shiitake Inst.)
132	AB251774	shizuoka G-1*	
133	AB251775	河村 I-6	
134	AB251776	河村 O-2	

135	AB251777	河村 K-2	
136	AB251778	河村 I-2	
137	AB251779	shizuoka M-34	
138	AB251780	河村 K-5	
139	AB251781		
140	AB251782		
141	AB251783		
142	AB251784	河村 510	(株)河村式種菌研究所 (Kawamurashiki Shukin Inst.)
143	AB251785	河村 508	
144	AB251786	河村 507	
145	AB251787		
146	AB251788	河村 407	
147	AB251789	河村 157	
148	AB251790	河村 105	
149	AB251791	河村 101	
150	AB251792	河村 409	
151	AB251793		
152	AB251794		
153	AB251795	河村 482	
154	AB251796		
155	AB251797		
156	AB251798	河村 S528*	(株)河村食用菌研究所 (Kawamura Shokuyoukin Inst.)
157	AB251799	河村 S490	
158	AB251800	河村 K307	
159	AB251801	河村 S54	
160	AB251802		
161	AB251803	河村 K3	
162	AB251804	河村 K5	
163	AB251805		

注)1) 種菌購入時の会社名
2) ** ２００６年８月現在育成者権のある登録品種
3) * 登録品種

(ｲ) IGS1-DNA シーケンスを用いる系統判別法の検証

IGS1-DNA シーケンスが、シイタケ品種の判別指標として実用的であるかどうかを次の様に検証した。1)（市販品種の特性）天然採集したシイタケ22菌株の IGS1シーケンスを決定(Accession 番号: AB250702ーAB250724)し市販シイタケ品種の IGS1シーケンスと比較した結果、 1 菌株(FMC42)を除き、天然採集菌株と市販品種の IGS1シーケンスは異なり、市販品種と天然採集菌株は明確に区別できることが分かった。つまり、天然採集菌株を容易に市販品種に育成できないことが分かった。2)（IGS1-DNA 指標の安定性の検証）市販品種中には、同一または、酷似した IGS1シーケンスを持つ品種群があることや、購入年に隔たりがある同一品種で、同一 IGS1シーケンスを示すことが分かった。3)（IGS1-DNA シーケンス指標によるシイタケ品種の判別能の検証）育成者権が同じ数品種を除き、入手可能な登録品種62品種は IGS1 指標で判別できることを明らかにした（図1218-2)。これらのことから、シイタケの品種判別指標として、IGS1-DNA シーケンスが実用的であることが分かった。

(ｳ) その他の成果

シイタケ89品種の RAPD 指標(プライマーOPA-7、-8, 0 PC-9、OPD-14、OPE-10、-17、OPG-1及び OPJ-7）のデータベースを得た。また、この RAPD 指標に対する STS(sequence tagged site)化プライマーを20組作製し品種判別に応用した。

輸入シイタケの系統解明をし、輸入シイタケの系統は、我が国の古い品種に酷似すること、また、乾シイタケの産地判別法として、商品中の品種の分布並びに、中国産の主系統（FMC155）の混在率が指標になることを明らかにし、それを報告することできのこ産業の平静化へ寄与した(馬場崎 2003、2005)。

食品表示違反として社会問題化した人工栽培融合松茸の種鑑定を行い、当該きのこが、30年以上前に

開発された市販品種から派生し、15年前に社会問題となったマツタケ様シイタケと同一品種または系統と鑑定した（馬場崎 2004）。

エ　考察

シイタケの品種判別・同定は、これまでは、地道に種苗登録の一作業として行われてきたが、近年、食の安全・安心や食品のトレーサビリティ等への国民の関心の高まり、知的財産立国を標榜し、品種の育成者権の保護強化を打ち出した政策の中で、その要望や目的を達成する為の不可欠な作業となった。既存の品種判別法は時間が掛かる上に、国際標準化に適さない点もあり便法であっても、簡易で客観的な手法の開発が要望された。DNA 判別法は、このような要望を満たす手法として期待され、特に、普及を考えると比較的安価で簡便な PCR 反応と電気泳動像を用いる多型分析法（RAPD 法、PCR-RFLP 法等）の開発が望まれた。このため、当初、本課題でも、シイタケ市販品種の RAPD 法による品種判別法を開発し、さらに、RAPD 指標の安定化のためにその指標の STS プライマー化を図った。しかし、現在でも、市販シイタケ品種の数が140品種以上もあり、また、毎年、その数が増加しているシイタケ品種の事情を考慮すると、PCR 反応と電気泳動像を用い対照区と比較して、品種名を相対的に推定する多型分析法では、限界があると判断した。理由の一つとしては、対照区として用いる品種を一般に購入できないばかりでなく、永続的に保存することは如何なる機関においても不可能であること。次に、計算上は、８つの DNA 指標があれば、140品種を判別できるが、遺伝背景の類似した品種間の判別では、沢山の DNA 指標が必要となること、さらに、今後増加する品種をも含めて問題なく品種判別するためには、常に、新たな DNA 指標を開発する研究を行う必要があり、その研究を継承することは、事実上、不可能であること。このようなことから、対照品種を必要としないシイタケ品種の絶対指標を用いる品種判別法を開発することへ方針を変更した。斉藤ら(2002)はシイタケ16品種の結果からシイタケの IGS シーケンスが品種間多型を示し品種指標として有用であることを示唆した。しかし、彼らの方法も相対指標を用いる PCR-RFLP 法によるもので、上述した理由から限界が分かった。この様なことから、ここでは、市販シイタケ品種の品種指標として IGS1-DNA シーケンスのデータベースを構築し、それを国際的な登録機関に登録し公開することことで、対照品種がなくても IGS1-DNA シーケンス情報のみでシイタケの品種名をインターネットで照合できる方法とすることに成功した。また、構築した IGS1-DNA プラスミドバンクは、今後は、対照区としても利用できる。

シイタケ品種の品種指標として IGS1-DNA シーケンスを用いることは、実用的と判断できるが、一方で、市販品種の中には、同一の IGS1-DNA シーケンスを持つ品種群もあり、その扱い、または、その解釈をいかにするか問題となる。本来、区別性の低い品種を別品種として扱っている場合や、作為はないが結果としてそのような状態になっている場合等、いろいろな場合が考えられるが、登録品種と未登録品種で同一の IGS1-DNA シーケンスがみられる場合は、育成者権の問題もあり、その対応を早急に論議する必要があると考える。

オ　今後の課題

シイタケの系統判別法及び、インターネットを用いるシイタケ品種の照合法の骨格は出来上がったと判断できるため、今後は、さらに利用可能な DNA シーケンス指標を増やし、シイタケ系統判別法の精度を上げることが必要と考える。利用可能な DNA シーケンス指標としては、IGS 2 -DNA シーケンス等が上げられる。また、他のきのこの系統判別法としても、同様な手法で、インターネット品種照合法を確立して行くことが必要と考える。

カ　要約

入手可能な市販シイタケ品種140品種の IGS1ー DNA のシーケンスデータベースを作り、DDBJ で公開した。天然採集菌株（22菌株）と市販品種（140品種）の IGS1-DNA シーケンスの間で１例を除き区別性があった。市販品種中には、同一又は、酷似した IGS1-DNA シーケンスを持つ品種群があった。購入年限に隔たりのある同一品種で、同一 IGS1-DNA シーケンスを示した。登録品種62品種は、育成者権が同じ数品種等を除き、IGS1-DNA シーケンスで判別可能であった。DDBJ 等、既存ホームページを利用することで、シイタケ品種のネット照合が世界中で可能になった。このように IGS1-DNA を指標とするシイタケ品種の実用的な DNA 判別法を開発することができた。

キ　引用文献

Zolan, M. E. , and Pukkila P. J. 1986. Inheritance of DNA methylation in Coprinus cinereus. Mol. Cell. Biol. 6：195–200

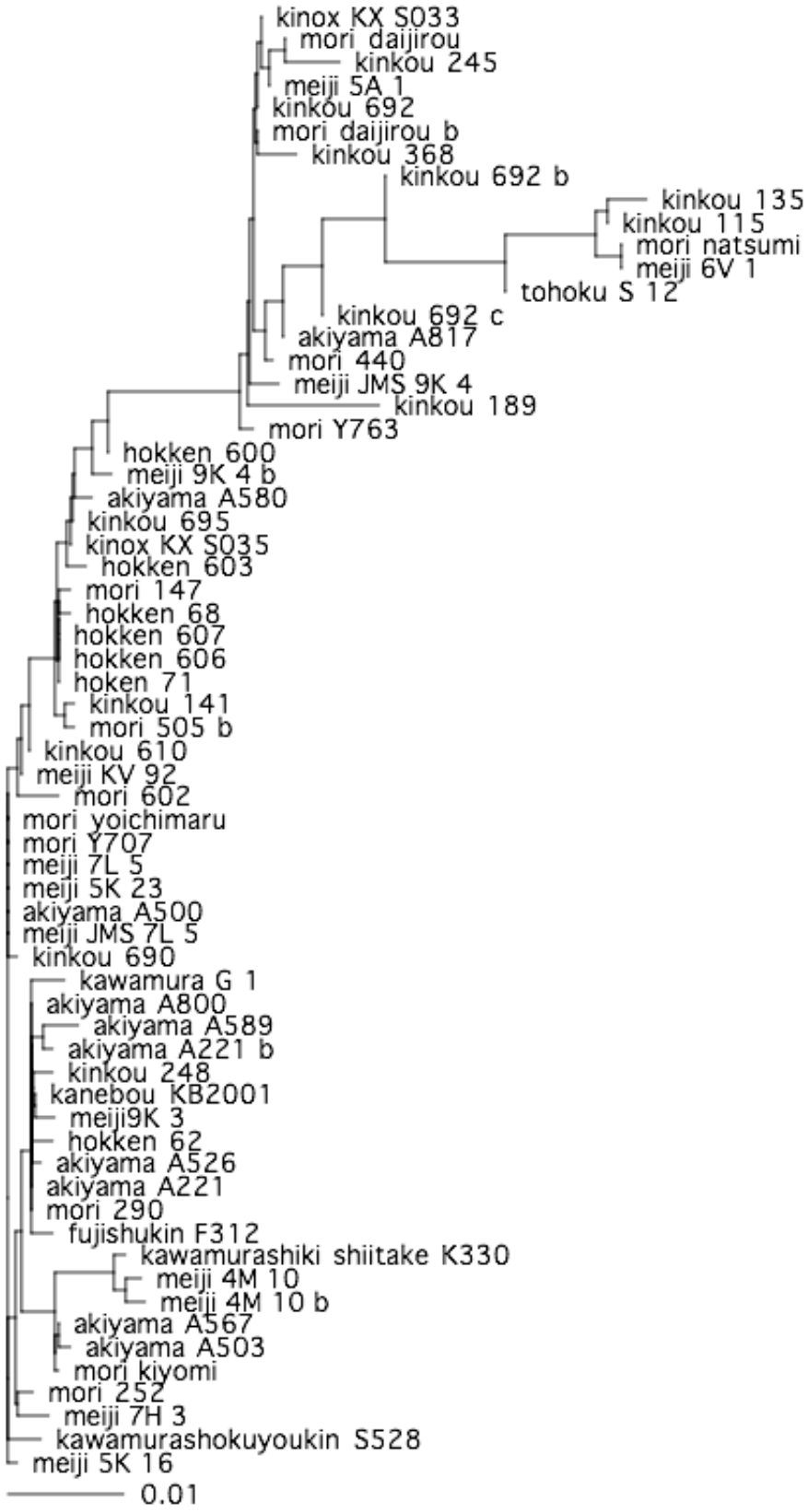


図1218-2　62登録品種の IGS1-DNA シーケンスから算出された樹形図

注）横線の長さが、非類似度を示す。

Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucl. Acids Res. 16 (22): 10881-10890

Saito T., Tanaka N., and Shinozawa T. 2002. Characterization of subrepeat regions within rDNA interginic spacers of the edible basidiomycete Lentinula edodes. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66:2125-2133

馬場崎勝彦、宮崎安将、宮崎和弘 2003. 輸入乾・生シイタケの系統判別. 特産情報. プランツワールド. 42-45

馬場崎勝彦 2004. きのこの「表示」. 林業技術. 日本林業技術協会. 12-15

馬場崎勝彦 2005 きのこの原産地判別で指標となる品種情報をデータベース化. TechnoInnovation. STAFF. 56 : 44-45

研究担当者（馬場崎勝彦）

19 レトロトランスポゾン･マーカーによる豆類加工品品種判別技術の開発

ア 研究目的

北海道で育成された豆類登録品種が、育成者の許可なく海外で生産され我が国に輸入される事態が生じたため、流通する生産物の検査によって品種を識別することができるDNAマーカーの開発が進められている。その結果、アズキ[*Vigna angularis*（Willd.）Ohwi & Ohashi]については、RAPD-STSやSSRを利用したマーカーが実用化され、子実1粒ごとの品種同定が可能となった。しかし、これらのマーカーは、検出される対立遺伝子（DNA長など）を複数の座位で組合せることにより品種を特定するため、品種がブレンドされ、原材料の仕分けが不可能な餡などの豆類加工品を対象とする場合には、品種の同定が難しくなる。このような加工品において登録品種の混入を立証するためには、登録品種に固有のDNAマーカーを見いだす必要がある。

レトロトランスポゾンは、「自身の転写配列(RNA)をDNAに複製し宿主ゲノムに挿入する」転移因子であり、高等植物のゲノムには、多くの種類（ファミリー）の配列が様々なコピー数で存在する(Kumar & Bennetzen 1999)。しかし、現状のゲノムに存在するレトロトランスポゾン配列のほとんどは塩基置換などにより転移能力を失っており、さらに、能力を維持している配列も配列のメチル化など植物側のエピジェネティックな制御を受けている(Jensen et al, 1999)。最近、タバコ(Grandbastien et al, 1989)とイネ(Hirochika et al, 1996)に次いでサツマイモにおいても、転移性の配列（*Rtsp-1*, *LIb*）が報告された(Tahara et al, 2004, Yamashita & Tahara 2006)。これらのうち、*LIb*については、サツマイモの系統が分岐した過程で転移したために、そこから派生した系統に固有の挿入部位が生じていることが見いだされた。さらに、このような系統固有の挿入接続部位をPCRにより検出することで、複数の品種がブレンドされた練り物加工品（イモ餡など）であっても、その系統の使用を高精度かつ高感度に同定できることが示された（田原ら 2005)。

レトロトランスポゾンは、一般に、コピー数の多いファミリーが多く、ゲノム中の少数の転移能を維持している配列を見いだすことは難しい。サツマイモにおいては、1）保存性の高い酵素領域の配列を利用したPCRにより、複製配列をゲノムから網羅的にクローニングし、2）これらを系統分類することで最近時点で転移したと見られるファミリーを選定し、3）エピジェネティックな制御が乱れ、通常は静止状態である配列でも活性化する培養細胞(Grandbastien 1998)を材料として、4）系統分類により選定したファミリーの配列について、転移の前提条件となる転写を確認し、5）末端部までの配列を同定して、ゲノム挿入位置についての包括的かつ詳細な系統間比較が可能なトランスポゾン・ディスプレー（S-SAP: Sequence-Specific Amplification Polymorphism, Waugh et al, 1997）により、カルスなどでの転移を確認する方法が採られた(Tahara et al, 2004)。

そこで、本研究では、このような方法に従い、まず、アズキのゲノムにおいて転移能を持つレトロトランスポゾンを同定し、その挿入場所を登録品種とその両親系統間で包括的に比較することで、品種育成過程において生じた、登録品種に固有の転移・挿入箇所を見いだすこととした。

イ 研究方法

(ｱ) 分析対象品種

アズキ登録品種、しゅまりときたのおとめの固有マーカー開発を研究目標として、それら2品種と親系統である十育130号と十系486号ならびにエリモ

ショウズ、宝小豆と円葉（宝小豆と円葉のF_5個体が交配に使われた）を実験材料として用いた。なお、しゅまりときたのおとめについて、葉および根を10μMの2-4Dを含有するMS培地に植え付けてカルスを誘導・育成した。

(ｲ) アズキ・レトロトランスポゾン配列の分析

しゅまりの葉から抽出したゲノムDNAを鋳型として、Ty1-*Copia*型レトロトランスポゾンの逆転写酵素領域のアミノ酸保存配列に設計した縮重プライマーを用いて、PCRを行った。プライマーの配列やPCR増幅は、Hirochika(1992)の方法に準じた。増幅した配列をクローニングし、そのうちの104個について塩基配列を決定した。アズキと最も近縁なリョクトウ[*V. radiata*（L.）Wilczek]について、同様の方法により調査された配列がデータベースに報告されていた(Dixit et al, 2006)ので、これらと併せて近隣接合法に基づき配列の系統分類を行った。

(ｳ) 転写解析

アズキ植物体（しゅまり）の葉および根ならびに葉または根由来のカルスから抽出したRNAを鋳型に、オリゴdTプライマー(5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTV-3')を用いて逆転写を行いcDNAを合成した。これを鋳型として、(ｲ)の分類にもとづき選定した7種類のファミリーについて、それぞれのファミリーに固有の逆転写酵素領域の配列で、3'方向に向けて2種類プライマーを設計し、オリゴdTプライマーのアンカー配列（5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3'）との間で、入れ子PCRとなるように3'RACE（Rapid amplification of cDNA ends）を行った。また、それぞれのファミリーの3'側のプライマーの配列と相補配列となるプライマーを設計して、5'側のプライマーとの間で、cDNAを鋳型とするRT-PCRを行った。

(ｴ) トランスポゾン・ディスプレー（S-SAP）

a　配列の転写解析により選定したファミリー（SGr-7）について、しゅまりのゲノムDNAを制限酵素*Ssp*Iで処理してアダプターDNAを結合させたものを鋳型に、SGr-7に固有の逆転写酵素領域の配列をもとに設計して3'RACEに使用したプライマー（SGr7-1：5'-AACCAGAGGGTTTTGAAGAACC-3'、SGr7-2:5'-AAGACCTCCGCAGACCAT-3'）を用いてSuppression PCR（Siebert et al, 1995)を行い、その延長にあたる3'末端部（LTR：Long terminal repeats）までの配列を決定した。

b　SGr-7ファミリーの3'末端部配列にプライマーを設計し(Gr7_ppt_LTR：5'-TTTATGGGGGAGTTTTGTTGAATAAAAC-3'、Gr7_LTR_SSAP：5'-CATAGTGCCCATTTTGGGGTTC-3'、Gr7-LTR-D1：5'-CCTACGTTTTCATTTTTACGCTTCCGC-3')、S-SAP法によりSGr-7配列の3'LTR末端とそれが挿入しているゲノム部位を増幅した。S-SAP法は、Yamashitaら(2006)の方法に準じた。しゅまりときたのおとめならびにそれらの親系統を分析対象とし、制限酵素として*Alu*Iまたは*Ase*Iを用いた場合はGr7_ppt_LTRおよびGr7_LTR_SSAPを、また、*Mse*Iを用いた場合はGr7_ppt_LTRの代わりにGr7-LTR-D1を、それぞれ配列特異的プライマーとして使用した。

ウ　結果

(ｱ) アズキゲノム中のTy1-*Copia*型レトロトランスポゾン配列分析

しゅまりのゲノムから網羅的にクローニングしたTy1-*Copia*型レトロトランスポゾンの逆転写酵素領域の配列を系統分類したところ、配列間の類似性が高い7種類のファミリー(SGr-1～7)が同定された（図1219-1)。このようなグループは、進化の時間軸において最近の時点で転移したために複製配列間での配列変異が少ないファミリーを形成しているものと考えられる。さらに、リョクトウの配列との比較では、これらのグループの中に、リョクトウ配列群とは独立したクラスターを形成するものが見られた（SGr-3、4、5、7など）ので、これらは、リョクトウとの種の分岐の後に、アズキのゲノム中で転移した配列群である可能性が示唆された。

(ｲ) 転写分析

上記7種類のファミリーについて、通常のアズキ植物体の葉および根ならびに育成した葉または根由来のカルスを対象に、3'RACE分析を行った。その結果、いずれのファミリーについても、転写後の調整を受けた産物(mRNA)として期待される、逆転写酵素領域から3'LTRにいたる配列は検出できなかった。一方、逆転写酵素領域のRT-PCR分析では、3種類のファミリー(SGr-3、6、7)について、設計したプライマーから期待される長さの断片が植物体およびカルスにおいて増幅し（図1219-2)、これら3ファミリーについては、カルスのみならず、植物体においても転写が行われていることが示唆された。これま

でにイネ、タバコ、サツマイモにおいて見いだされた転移性の配列については、植物側の調整による転写の制御が転移のチェックポイントとなっている。このため、SGr-3、6および7のファミリーの中には転移性の配列が含まれる可能性が考えられたので、これらのうち、SGr-7についてさらに分析を進めた。

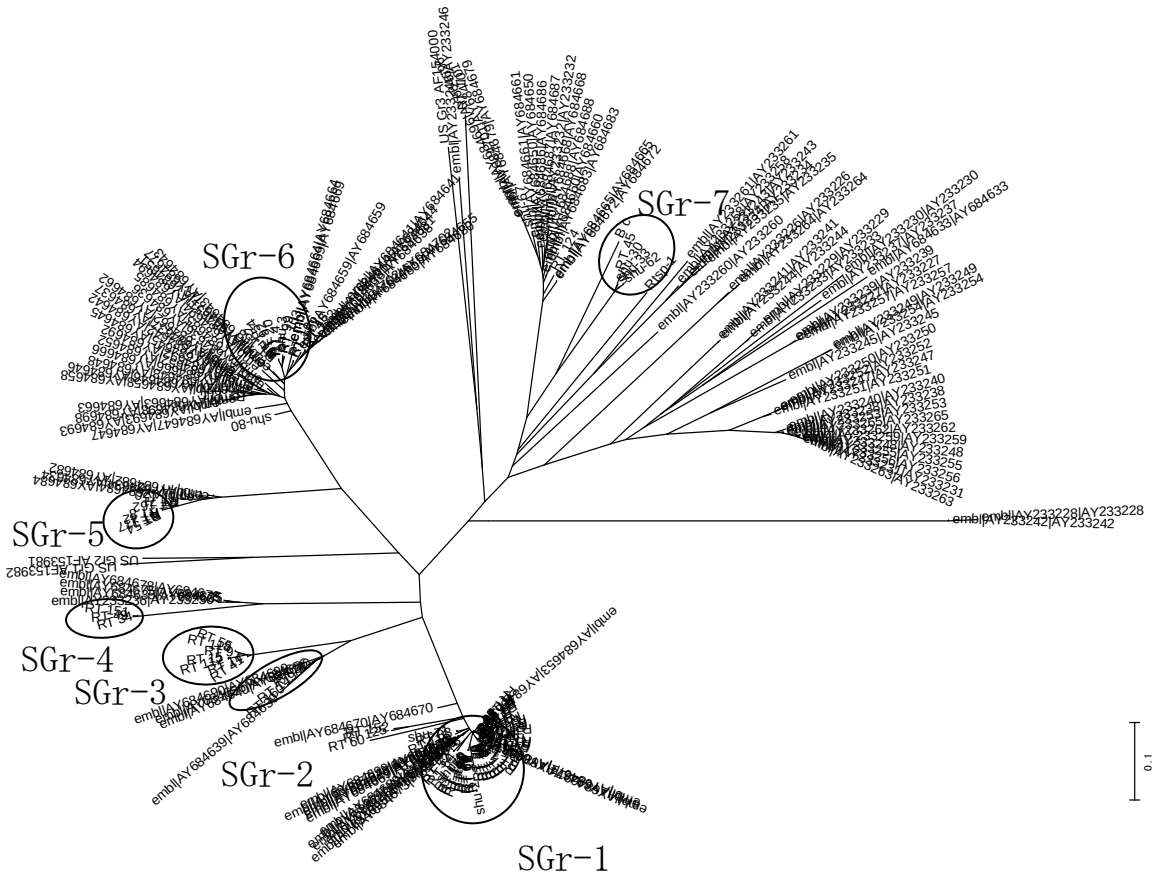


図1219-1　アズキとリョクトウのTy1-*Copia*型レトロトランスポゾンの系統分類
RTから始まる系統名はアズキ、また、emblから始まる系統名はリョクトウの配列を示す。

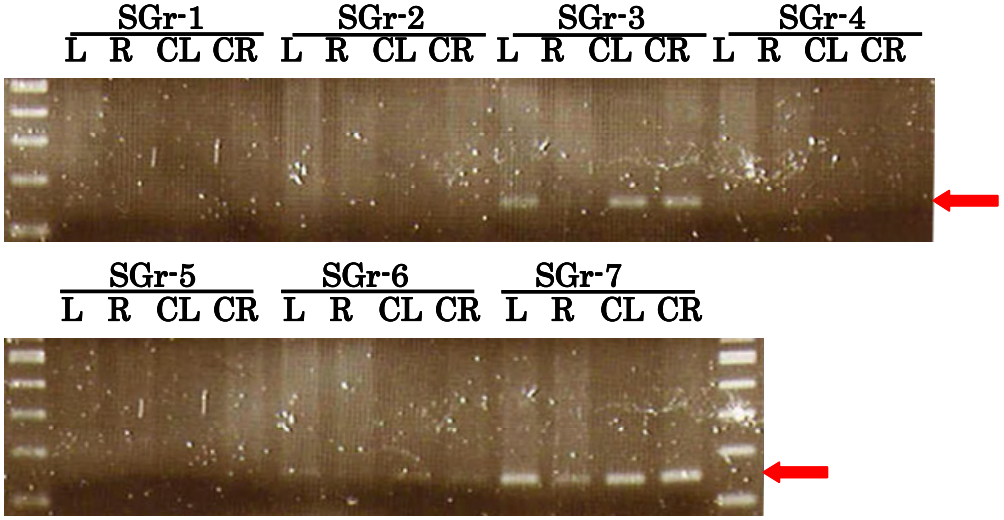


図1219-2　グループ特異的逆転写酵素配列によるRT-PCR
L、R、CLおよびCRは、それぞれ通常植物体の葉、根、葉由来のカルスおよび根由来のカルスから抽出したサンプルであることを示す。

(ｳ) トランスポゾン・ディスプレー（S-SAP）

しゅまりのゲノム DNA を鋳型に、SGr-7に固有の逆転写酵素領域配列を利用して Suppression PCR を行い、得られた複数の断片について塩基配列を決定した。これらの配列を整列して比較したところ、配列はいずれも SGr-7ファミリーの逆転写酵素領域の繋がりであり、LTR 両末端の保存配列などから、LTR とその3’末端を推定することができた。

S-SAP 法によりシーケンスゲル上に検出される断片は、レトロトランスポゾン LTR 末端部とそれに接続するゲノム DNA である。LTR 末端部の配列は共通であるが、ゲノム DNA 部は LTR 接続部位からそれに最も隣接する制限酵素認識部位となる。制限酵素認識部位までの長さはレトロトランスポゾンが挿入された場所ごとに異なることが期待される。さらに使用する制限酵素の種類を変更することで、同じレトロトランスポゾンの挿入部位について、さらに包括的に比較することができる。SGr-7ファミリーの3’末端配列を利用した S-SAP により、しゅまりおよびきたのおとめとそれらの親系統との間で、SGr-7ファミリーの挿入位置を比較した。その結果、*Mse*I を用いた分析の電気泳動像（図1219-3）が示すように、SGr-7ファミリーの配列はアズキゲノム中に比較的多数の挿入箇所があるものの、供試した品種間における挿入位置の違いは少ないことが分かった。*Ase*I を用いたものでは、しゅまりには存在するがその両親のいずれにも存在しないと見られる断片が観察された（図1219-4の左パネル）。また、*Alu*I を用いて、しゅまりのカルスを分析したものでは、カルスに固有とみられる断片が観察された（図1219-4の右パネル）。しかしながら、きたのおとめでは、固有の挿入を示す断片はいずれの制限酵素処理においても見いだされなかった。なお、しゅまりに固有の断片とみられたものは、クローニングできていない。

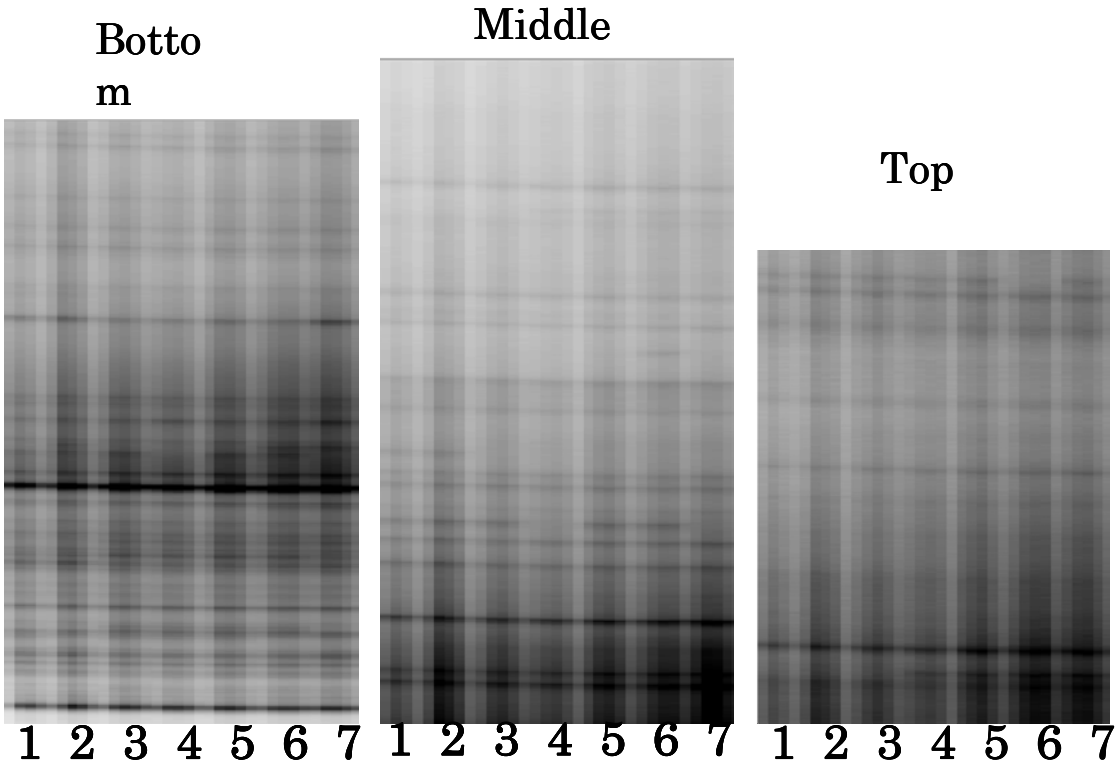


図1219-3　制限酵素 *Mse*I による SGr-7ファミリー3’末端配列 S-SAP 分析結果

１枚の泳動写真を３つのパネル（Bottom、Middle と Top）に分割して示した。Bottom、Middle および Top の各パネルにおける最長 DNA は、それぞれ、おおよそ250bp、450bp および600bp である。レーン１～７には、それぞれ、しゅまり、十育130号、十系486号、きたのおとめ、エリモショウズ、宝小豆および円葉を泳動した。

エ　考察

アズキのゲノムから、Ty 1 –*Copia* 型レトロトランスポゾンを網羅的にクローニングして分析した結果、ゲノム進化の比較的最近の時点で転移したと見られるファミリーが存在し、逆転写酵素領域配列が転写されているファミリーも確認された。SGr–7ファミリーの S–SAP 分析においては、多数の断片が増幅したことから、このファミリーについてはアズキゲノム中に比較的多数のコピーが存在することが明らかになった。しかしながら、SGr–7ファミリーの挿入部位は、供試した品種とその親系統間で違いがあまり見られなかった。同様の分析を中国のアズキ在来品種について行っても同じ傾向が見られたため、このファミリーは、アズキが栽培作物化される段階の始祖集団において既に多数のコピーが存在し、栽培作物となった後の品種分化などの段階ではあまり転移しなかったことが想定される。また、逆転写酵素領域配列の転写については、自身の配列の発現による転写以外に、SGr–7ファミリーのコピー数が多いためにアズキの構造遺伝子の下流に偶然挿入されたコピーがあり、この構造遺伝子の発現に伴う読み過ごし産物として転写されている可能性も考えられる。

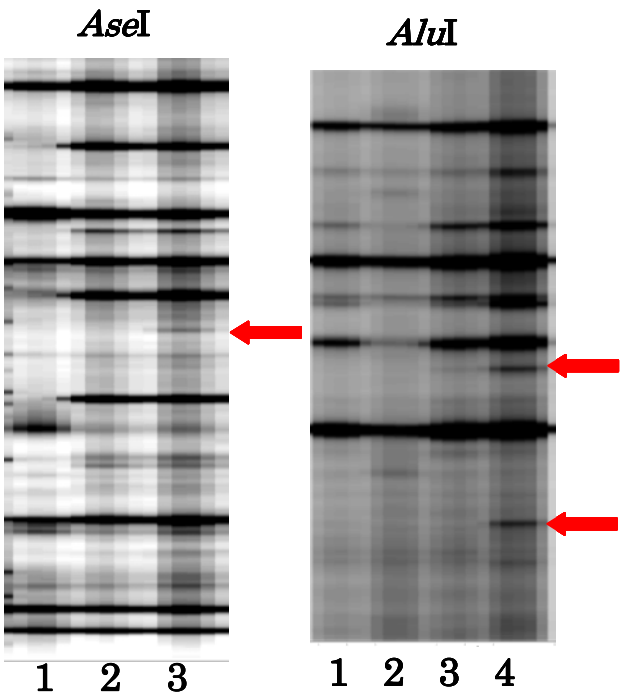


図1219–4　制限酵素 *Ase*I および *Alu*I によるしゅまりとその両親系統の SGr–7ファミリー3’末端配列 S–SAP 分析結果
レーン１、２、３および４には、十育130号、十系486号、しゅまりとしゅまりのカルスを泳動した。

オ　今後の課題

今後の研究としては、転移性の配列が含まれる可能が示された SGr–3と 6 のファミリーについて分析を進める。その際、S–SAP 分析によって、まず、品種間の挿入位置の多型性の程度を確認することとする。

品種に固有の挿入は、登録品種とその両親の間で挿入部位を比較することにより最も確実に同定できるが、実際に栽培されている品種の範囲の中で、対象とする登録品種にのみ存在すると見られる挿入部位を複数箇所同定できれば、実用的な遺伝マーカーとして活用できるものと考えられる。最近、ヒトのレトロトランスポゾン（SINE: Short Interspersed Nucleotide Elements）である Alu について、個人間の挿入多型（比較のもととなる個人のゲノムにはその位置に挿入がないが、比較する複数の人のいずれか１人には挿入がある）をゲノム全域を対象に検定する方法が示された（Mamedov et al, 2005）。この方法は、レトロトランスポゾンのようにゲノム中に散在する反復配列であれば、転移・挿入の歴史が不明なものでも挿入多型が同定できるとされている。SGr–3や 6 ファミリーについては、S–SAP 法以外にもこの方法を利用して、①登録品種とその親系統間の比較により、登録品種にのみ存在する挿入位置を検索する、②実際の検査の対象となるような栽培品種群内で多型を示す挿入部位を多数検出し、検査において必要となる品種に固有の挿入箇所を同定することとしたい。

カ　要　約

北海道育成のアズキ品種（しゅまりときたのおとめ）について、品種がブレンドされた加工製品においても識別が可能な品種固有の DNA マーカーを開発することを目標に、転移性のレトロトランスポゾンを同定し、登録品種の育成過程で生じた固有の挿入を見いだすこととした。転移性レトロトランスポゾンの同定と品種固有マーカーとしての利用は、サツマイモにおいて先例があったので、その方法に従って研究を行った。アズキゲノムからクローニングした Ty 1 –*Copia* 型レトロトランスポゾン配列を系統分類し、それら配列の転写を調査した上で、転移性の配列を含む可能性のあるファミリーを 3 種類（SGr–3、6 、 7）選定した。これらのうち、SGr–7ファミリーについて、 3’末端までの配列を同定して、品種間で

の挿入多型を包括的に検証する S-SAP 分析を行ったが、品種間の挿入多型は少なく、品種固有の挿入部位を同定するまでには至らなかった。今後は、SGr-3と6ファミリーについて、ヒトのレトロトランスポゾンにおいて新たに開発された個人間の挿入位置多型をゲノム全般にわたり検出する方法をも取り入れて研究を進める。

キ　引用文献

Dixit A, Ma KH, Yu JW, Cho EG, Park YJ. 2006. Reverse transcriptase domain sequences from Mungbean (*Vigna radiata*) LTR retrotransposons: sequence characterization and phylogenetic analysis. Plant Cell. Rep. :25:100-11.

Grandbastien, M. A., Spielmann, A., Caboche, M. 1989. Tnt 1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. Nature:337:376–380.

Grandbastien MA. 1998. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. Trends. Plant Sci.: 3: 181-187.

Hirochika H, Fukuchi A, Kikuchi F. 1992. Retrotransposon families in rice.

Mol Gen Genet.:233:209-216.

Hirochika, H., Sugimoto, K., Otsuki, Y., Tsugawa, H., Kanda, M. 1996. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA:93:7783–7788.

Jensen, S., Gassama, M. P., Heidmann, T. 1999. Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing. Nat Genet:21:148–149.

Kumar, A., Bennetzen, J. L. 1999. Plant retrotransposons. Annu. Rev. Genet.:33:479–532.

Mamedov IZ, Arzumanyan ES, Amosova AL, Lebedev YB, Sverdlov ED. 2005.

Whole-genome experimental identification of insertion/ deletion polymorphisms of interspersed repeats by a new general approach. Nucleic Acids Res. :26: 33(2):e16.

Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A., Lukyanov, S. A. 1995. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. Nucl Acids Res.: 23:1087–1088.

Tahara, M., Aoki, T., Suzuka, S., Yamashita, H., Tanaka, M., Matsunaga,, S. Kokumai, S. 2004. Isolation of an active element from a high-copy- number family of retrotransposons in the sweetpotato genome. Mol. Gen. Genomics.:272:116–127.

Waugh R, McLean K, Flavell AJ, Pearce SR, Kumar A, Thomas BBT, Powell W. 1997. Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). Mol. Gen. Genet.:253: 687-694

Yamashita H, Tahara M. 2006. A LINE-type retrotransposon active in meristem stem cells causes heritable transpositions in the sweet potato genome. Plant Mol. Biol.:61:79-94.

田原　誠・大江夏子・山下裕樹・丸谷　優・國米修平. 2005.　加工食品の原料品種判定方法. 特許, 特願2005－187107, 2005年6月27日出願.

研究担当者（田原　誠*、山下裕樹、大山由美）

第3章　畜産物品種・個体判別技術の開発

1　ウシ品種識別技術の開発

ア　研究目的

牛肉の不当表示には、国内産における牛品種の偽装および輸入牛肉を国内産牛肉とする2つの問題がある。前者ではホルスタイン種と黒毛和種の第一代交雑種（F1）やホルスタイン種の牛肉を「黒毛和牛」と偽るケースである。消費者の信頼と牛肉の消費量回復には、不当表示に対する抑止効果が出来る品種鑑定技術の開発が必須である。本研究では、AFLP法や品種を区分する機能遺伝子の開発により、黒毛和種とホルスタイン種およびその交雑種間の識別、さらに輸入牛肉と国内産牛肉を識別できるDNA鑑定法を確立することを目的とした。

イ　研究方法

(ｱ) 国内産牛の品種鑑定法開発

国内産牛の品種鑑定法開発には、Vos et al.（1995）によって開発されたAFLP法に基づいたゲノムスキャニングを黒毛和種とホルスタイン種に対して行った。得た品種特異的なAFLPバンドをクローニングし、その塩基配列情報に基づいた簡便なSNPs検出法を開発した。得られたSNPsマーカーを用いて、各品種の遺伝子頻度を計算し、これらを利用しての品種識別精度を検証した。

(ｲ) 豪州産輸入牛肉と国産牛肉を識別するDNAマーカーの開発

本研究は、輸入牛肉と国内産牛肉を識別できるDNAマーカーの開発を目的とした。対象とする輸入牛肉は輸入牛肉の大部分を占めるオーストラリア産牛肉（豪州産牛肉）およびアメリカ産牛肉（米国産牛肉）であるが、研究開始時点で米国産牛肉の輸入は禁止されているので、まず対象を豪州牛肉に絞った。これら輸入牛肉のサンプルに対し、Y染色体やミトコンドリアDNAを中心としたインド牛特異的なマーカーの開発を進めた。さらにAFLP法や毛色関連遺伝子を用いた識別マーカーの開発にも着手し、輸入牛に対する検出率の向上を目指した。開発したマーカーを用いて輸入牛における遺伝子頻度を検討し、これを用いて輸入牛に対する検出確率および鑑定精度を算出することにより鑑定能の評価を行った。

a　Y染色体に由来するSry遺伝子に基づくマーカー開発

ウシのSRY遺伝子（全690bp）のうち、641bpの位置においてアミノ酸置換を伴う多型が認められている(Tanaka et al. 2000）。この多型は*B. taurus*型と*B. indicus*型を区分できる可能性が示唆されているため、識別マーカーとして有効であると考えた。

b　ミトコンドリアDNAに基づくマーカー開発

ミトコンドリアDNA内のND4およびND5遺伝子内に存在する点突然変異を対象とした。この多型に対し、PCR-RFLP法を適用し、識別マーカーとなりえるかを検討した。

c　AFLP法によるマーカー開発

国内産牛の品種鑑定法開発と同様の方法に基づきマーカー開発を行った。

d　毛色関連遺伝子MC1Rに基づくマーカー開発

MC1R遺伝子は茶毛色に関連する対立遺伝子eの存在が知られている（Sasazaki et al. 2005)。この多型を検出するようにPCR-RFLP法を適用し、黒毛和種、ホルスタイン種、豪州産牛における遺伝子頻度を評価した。

ウ　研究結果

(ｱ) 国内産牛の品種鑑定法開発

約1000プライマーセットを用いたAFLPゲノムスキャニングを黒毛和種とホルスタイン種に対して行った。その結果、最終的に品種識別に有効な5つの新しい識別マーカーを得た。また、これらのマーカーに対して簡便に分析できるようSNPsに転換し、PCR-RFLP法によって分析できる方法を開発した(図1301-1)。得た5つの識別マーカーおよびこれまでに開発した識別マーカー6つを用い、黒毛和種296頭、ホルスタイン種100頭、交雑種96頭に対して分析を行い、遺伝子頻度の推定を行った（表1301-1)。その結果、これら11マーカーの内、精度の高い6つのマーカー（BIMA1, 6, 7, 8, 9, 11）を用いることが品種識別に有効であると考えられた。特に精度の高い4マーカー（BIMA1, 7, 8, 11）を使用した場合では、F1の検出率が91.7%であり、その信頼度99.3%であった。またF1の検出率を上昇させるためには、6つすべてのマーカーを用いると、F1の検出率96.7%、信頼度

97.6%となった。

これらのマーカーは黒毛和種とホルスタイン種間の識別にも有効であった。精度の高い4マーカー（BIMA1,7,8,11）を使用した精度は、ホルスタイン種の検出率99.3%、誤判別率0.7%（信頼度99.3%）であった。また特に精度の高い2種類のみのマーカー(BIMA7，8)を用いた場合では、検出率81.1%、信頼度100%であった。

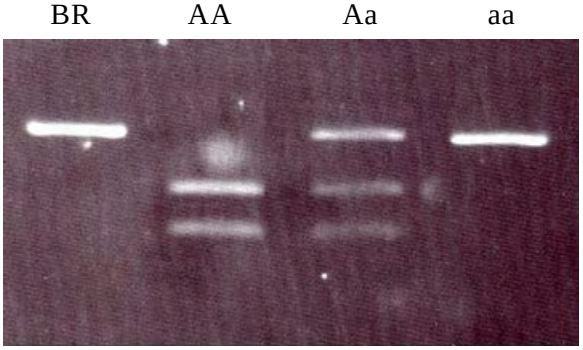


図1301-1 識別マーカーの分析例（BIMA8）
BR:制限酵素切断前、A:ホルスタイン種に高頻度に観察される対立遺伝子、
a:黒毛和種で低頻度な対立遺伝子

表1301-1 開発マーカーの遺伝子頻度

	黒毛和種 (296)	ﾎﾙｽﾀｲﾝ種 (100)	F1 (96)
BIMA1	0.0017	0.575	0.215
BIMA2	0.0431	0.470	0.205
BIMA3	0.045	0.435	0.214
BIMA4	0.055	0.525	0.288
BIMA5	0.0448	0.620	0.283
BIMA6	0.0034	0.365	0.163
BIMA 7	0.0000	0.400	0.181
BIMA 8	0.0000	0.275	0.140
BIMA 9	0.0052	0.370	0.137
BIMA10	0.0155	0.380	0.170
BIMA11	0.0016	0.550	0.214

（ ）は分析した頭数を示す。

（ｲ）豪州産輸入牛肉と国産牛肉を識別する DNA マーカーの開発

Y染色体上の性決定遺伝子のSry遺伝子を対象とし、ヨーロッパ系牛とインド系牛を区別するSNPsの分析を、黒毛和種、ホルスタイン種、インド系牛（ラオス･ミャンマー在来牛)、豪州産牛に対して行った（図1301-2）。黒毛和種、ホルスタイン種ではすべて *B. taurus* 型であり、インド系牛では96.7%が *B. indicus* 型であった。豪州産牛では20.2%が *B. indicus* 型を示し、品種鑑定のマーカーとして利用できることが示された（表1301-2)。

ミトコンドリアDNA遺伝子マーカーでは、ND4、ND5遺伝子の SNPs を利用しマーカー開発を行った（図1301-3)。２つのマーカーを用いることにより、黒毛和種、ホルスタイン種ではすべて *B. taurus* 型と判定され、インド系牛では99.0%が *B. indicus* 型を示した。豪州産牛では47.3%が *B. indicus* 型を示し、品種鑑定のマーカーとして利用できることが示された（表1301-2)。

AFLP分析では、黒毛和種、ホルスタイン種、アンガス種、ヘレフォード種、豪州産牛、インド系牛、各8個体に対して446プライマーセットの1次スクリーニングを終了した。候補バンドに対しては2次スクリーニングを行い、結果として14バンドが候補となっている。その内1つはSNPsマーカーへの転化が終了しており、黒毛和種･ホルスタイン種で0.0%、豪州産牛では17.4%の頻度を示した。検出頻度が低いながらも、品種鑑定のマーカーとして利用できることが示された。

毛色関連遺伝子MC1R遺伝子についても検討した結果､対立遺伝子eの遺伝子頻度は黒毛和種で0.5%、ホルスタイン種で0.6%、豪州産牛では33.7%の頻度を示し、有効なマーカーとなると考えられた（表1301-3)。

これら5つのマーカーに基づいた鑑定精度を計算した所、83.6%の豪州産牛が識別可能であり、誤判定率は1%であった。

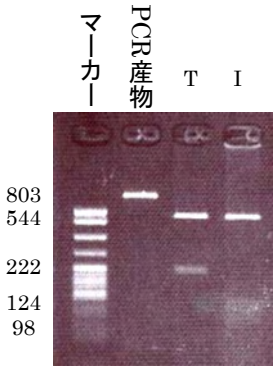


図1301-2　Sry マーカーの分析例
T：B. taurus 特異的パターン
I：B. indicus 特異的パターン

図1301-3　mtDNA マーカーの分析例
T：B. taurus 特異的パターン
I：B. indicus 特異的パターン

表1301-2　Sry および mtDNA マーカーの対立遺伝子頻度

マーカー名	多型解析での頻度								
	黒毛和種			ホルスタイン種					
	I	T	p	I	T	p			
SRY	0	255	0.000	0	47	0.000			
ND4	1	261	0.009	0	100	0.000			
ND5	0	268	0.000	0	98	0.000			
	ミャンマー在来牛			ラオス在来牛			オーストラリア産牛肉		
	I	T	p	I	T	p	I	T	p
SRY	46	2	0.958	48	1	0.980	41	162	0.202
ND4	50	0	1.000	49	1	0.980	130	148	0.468
ND5	50	0	1.000	49	1	0.980	131	146	0.473

表1301-3　MC1R 遺伝子マーカーにおける対立遺伝子頻度

品種	Σ	遺伝子型頻度			対立遺伝子頻度	
		E/E	E/e	e/e	E	e
黒毛和種	215	213	2	0	0.995	0.005
ホルスタイン	89	88	1	0	0.994	0.006
ヘレフォード	80	3	34	43	0.250	0.750
アンガス	101	86	15	0	0.926	0.074
豪州牛	175	90	52	33	0.663	0.337

エ　考　察

(ア) 国内産牛の品種鑑定法開発

本研究の結果、90%以上の確度を有するマーカー開発に成功した（Sasazaki et al. 2004, 2006)。これらの信頼度や検出率は用いるマーカーや品種、検出されたマーカーによって異なるが、概ね信頼度は99%以上である。この鑑定精度は開発に用いた黒毛和種約300頭とホルスタイン種約100頭から得られた結果であるが、どちらの品種共に地域の偏りを避け、全国よりランダムサンプリングにより得た結果であることから、実際の判別にも大きくは影響ないであろう。

これらは品種を100%鑑定できるマーカーではない。しかし、開発された方法により疑わしいと判断されたものについては、トレーサビリティーによる個体識別を適用し、はっきりした識別を行うことも可能である。よって、スクリーニング検査としてはこの精度で十分であると考えられた。

(イ) 豪州産輸入牛肉と国産牛肉を識別する DNA マーカーの開発

Y 染色体上の Sry 遺伝子マーカー、ミトコンドリア DNA の ND4および ND5遺伝子の SNPs マーカー、AFLP 法に基づく SNPs マーカー、毛色関連遺伝子 MC1R 遺伝子マーカー、合計 5 つのマーカーを開発した。これらマーカー用いて求められた遺伝子頻度から鑑定精度が計算された。その結果、83.6%の豪州産牛肉が識別可能であり、誤判定率は1%であった。このシステムは豪州産牛肉をかなりの確度で識別可能であり、有効なマーカーシステムといえる。今後はこの確度を上昇させるために、さらなるマーカー開発が重要である。

オ　今後の課題

(ア) 国内産牛の品種鑑定法開発

国内品種を識別するマーカー開発は成功した。今後は偽装表示を抑制するためにも、これらシステムの利用とこれを含む検査の十分な公知が重要であると考えられる。

(イ) 豪州産輸入牛肉と国産牛肉を識別する DNA

マーカーの開発

豪州産牛に対する検出精度を上昇させるため、引き続き AFLP 法を適用した品種鑑定可能な候補バンドの探索を行い、有効な SNPs マーカーの開発が必要である。また、MC1R の様な機能遺伝子に着目したマーカー開発の検討も重要であると考えられた。最終的にはこのようなマーカーにより、95%以上の輸入牛肉が識別可能であり、誤判別率1%以下のマーカー開発が必要と考えられる。

また、米国産牛肉に対しても同様の分析が適用可能であり、サンプル入手が可能となればただちに米国産牛肉と国産牛肉を識別可能なマーカー開発に取り組む必要がある。これら国産牛肉と輸入牛肉の鑑別法が開発されれば、輸入牛肉を国産牛肉とする偽装表示の抑止が可能であり、消費者の牛肉販売に対する信頼の回復と購買力の促進につながるであろう。

カ　要　約

(ア) 国内産牛の品種鑑定法開発

国内産牛の黒毛和種、ホルスタイン種、およびその交雑種を識別する DNA マーカーの開発に取り組んだ。最終的に品種識別に有効な11のマーカーを開発し、特に精度の高い 4 マーカーが品種識別に有効であり、F 1 の検出率が91. 7%、信頼度が99. 3%であった。このマーカー開発により、国内産牛の品種鑑定技術が完成した。

(イ) 豪州産輸入牛肉と国産牛肉を識別する DNA マーカーの開発

豪州産牛を対象とする輸入牛肉と国産牛肉を識別する DNA マーカーの開発に取り組んだ。Y 染色体、ミトコンドリア DNA、AFLP-SNPs、MC 1 R 遺伝子に由来するマーカー開発により、83. 6%の豪州産牛が検出可能であり、誤判定率は1%であった。

キ　引用文献

Sasazaki, S., K. Itoh, S. Arimitsu, T. Imada, A. Takasuga, H. Nagaishi, S. Takano, H. Mannen, S. Tsuji. 2004. Development of Breed Identification Markers derived from AFLP in beef cattle. Meat Sci. 67:275-280.

Sasazaki, S., M. Usui, H. Mannen, C. Hiura and S. Tsuji. 2005. Allele Frequencies of the Extension locus encoding the melanocortin-1 receptor (MC1R) in Japanese and Korean cattle. Anim. Sci. J. 76: 129-132.

Sasazaki, S., T. Imada, H. Mutoh, K. Yoshizawa, H. Mannen. 2006. Breed Discrimination using DNA Markers derived from AFLP in Japanese Beef cattle. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 19:1106-1110.

Tanaka K., Okada Y., Kuroiwa A., Yamagata T., Namikawa T., Amano T., Mannen H., Kurosawa Y., Nozawa K., Nishibori M., Yamamoto Y., Nguyen H. N., Phan X. H., Trinh D. T., Dang V. B., Chau B. L., Nguyen D. M., Bounthong B., Kaviphone P., Sonlivanh N. & Bounna P. 2000. An Assay for Paternal Gene Flow between the Taurus-type and Indicus-type Cattle in Laos and Vietnam Using Variation in SRY Gene. Report of the Society for Researches on Native Livestock. 18: 59-64.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T. V. D., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. & Zabeau M. 1995. AFLP:a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Research. 21: 4407-4414.

研究担当者（万年英之*）

2　市場における牛品種推定法の有効性の検証

ア　研究目的

生鮮食品品質表示規準が制定されたことにより、畜産物においても産地表示が義務付けられた。また、公正競争規約では、和牛表示の範囲が定められている。しかしながら、牛肉においては BSE 問題に端を発した種々の偽装が明らかとされ、表示制度の信頼性確保が求められている。表示制度の信頼性を確保するために、表示と内容物との整合性を確認する科学的方法が求められている。

黒毛和種とホルスタイン種等の識別技術については、神戸大等が DNA 多型を用いる方法を開発している。消費技術センターでは、この手法を元に、実際の検査手法として用いる手順を検討するとともに、どこで、誰が行っても同じような結果が得られることを示すことを目的とする。同時に、本品種推定法が、表示制度の信頼性の確保に有効であるかどうかを検証する。

イ　研究方法

(ア) 牛肉からの DNA マーカーを用いた品種推定法の開発（神戸大学等)に並行し、検査現場で活用でき

るように試験方法の細部を検討し、より簡便、迅速な方法とし、マニュアル化する。

(ｲ) 作成したマニュアルを用い、国内に流通している牛肉を分析し、マニュアルの実用化について検討する。

(ｳ) 複数の機関で、共同試験を行い、本手法が問題なく実施できるかを確認する。また AOAC 等の手法を参考として、本手法の妥当性確認手法を検討・確立するとともに妥当性試験を実施する。

ウ　研究結果

(ｱ) 神戸大学等の開発した11種類の DNA マーカー（公開特許公報（A)、特開2005－27655）のうち４つのマーカーを用いる方法で、分析マニュアルを作成した。神戸大等の方法は、黒毛和種にはまれな遺伝子変異（A 型という）を PCR あるいは PCR-RFLP の手法を用いて検出するもので、A 型の出現頻度からマーカーの組み合わせによる黒毛和種以外の交雑種あるいはホルスタイン種の検出率及びその信頼度が計算される。今回採用した４つのマーカーの組み合わせでは、交雑種の検出率は91.7%、信頼度は99.7%とされている。DNA 抽出に市販のキットを用いる等、ある程度簡略化することができた。マーカー１は59度、マーカー２は62度、マーカー３及びマーカー４は65度のアニーリング温度とした。マーカー１、マーカー２及びマーカー３については、PCR-RFLP の手法を用い、電気泳動をアガロースゲルで行う方法とした（ただし、マーカー１とマーカー２及びマーカー３では制限酵素が異なることから同じ条件で行うことはできなかった。)。マーカー４では3bp の違いを見る PCR の手法を用い電気泳動をアクリルアミドゲルで行う方法とした。この結果、PCR は３条件、制限酵素２種類、電気泳動方法２種類となった。

(ｲ) 作成したマニュアルを用いて、市販されている牛肉を買い上げて分析した。その結果、黒毛和種表示のあるもの308点中黒毛和種以外と判定されたものは23点（検出率7.47%）であった。これらの試料は、来歴が明らかでないことから、マーカー自体の信頼性について考察することはできないが、分析操作上は特に問題はなく、市販品のスクリーニング方法として問題ないことがわかった。

(ｳ) 16年度に７機関の参加による共同試験を行った。各機関には18点のブラインド試料（牛肉）を送付した。分析結果は McClure（1990）の方法に従い、Cochran の方法によって棄却機関の検定をした。棄却されなかった機関のデータを用いて、分析の妥当性を示す４つの指標（感度、特異性、偽陽性率、偽陰性率）を計算した。その結果、マーカー１とマーカー４でそれぞれ１機関が棄却機関となり（表1302-1)、そのデータを除いて計算すると、各マーカーで感度及び特異性で0.97以上偽陽性率及び偽陰性率で0.05以下と良好であった（表1302-2)。しかしながら、PCR 条件が多いこと、標準試料の必要性などの問題点が明らかとなった。

表1302-1　７機関による共同試験結果（正答数）

	正答数	誤答数	棄却機関数	棄却後正答数	棄却後誤答数
マーカー1	120	6	1	102	0
マーカー2	124	2	0	124	2
マーカー3	126	0	0	126	0
マーカー4	120	6	1	100	2

表1302-2　７機関による共同試験結果（感度、特異性、偽陽性率及び偽陰性率）

	感度	特異性	偽陽性率	偽陰性率
マーカー1	1.00	1.00	0.00	0.00
マーカー2	0.98	0.99	0.02	0.01
マーカー3	1.00	1.00	0.00	0.00
マーカー4	1.00	0.97	0.05	0.00

(ｴ) 16年度の段階で､PCR 条件の異なっていたマーカー 1 及びマーカー 2 について、プライマーを検討することによって PCR 条件をほかの 2 マーカーと合わせることができた。また、電気泳動方法をアクリルアミドゲルによる方法に統一し、マーカー 1 についてもプライマーの変更により PCR 増幅産物の大きさを小さくしたことから制限酵素処理を行わないで、3bp の違いを見る方法とした。これらの結果、PCR1 条件、制限酵素 1 種類、電気泳動方法 1 種類とすることができた（表1302-3～6及び図1302-1)。これらの改良点を分析マニュアルに盛り込んだ。

表1302-3　PCR 溶液の組成

	液量/tube	終濃度
滅菌水 10 ×EX Taq Buffer dNTP (2.5 mmol/L each) EX Taq HS (5 U/μL) プライマー対 (10 μmol/L each 鋳型 DNA	14.4 μL 2.5 μL 2 μL 0.1 μL 0.5μL 5 μL	 1 × 200μmol/L each 0.5 U/tube 0.2μmol/L each
全量		

表1302-4　PCR の温度サイクル（マーカー 1 ～ 4 共通）

	温度	時間	サイクル数
最初の変性	94℃	3 min	1
変性 アニーリング 伸長反応	94℃ 65℃ 72℃	30 sec 30 sec 30 sec	30
最後の伸長反応	72℃	7 min	1
保存	4℃	-	-

表1302-5　制限酵素(*Taq* I)処理の反応液組成

	液量	終濃度
滅菌水 10×Buffer Taq I Taq I (10 U/μL) PCR 反応液	1.25μL 2μL 0.5μL 5μL	 1 × 5 U/tube
全量	20μL	

表1302-6　マーカー 1 ～ 4 におけるバンドパターン

	PCR 産物長(bp)			制限酵素処理後の長さ(bp)		
	A 型	B 型	AB 型	A 型	B 型	AB 型
マーカー1	123	126	123/126	-		
マーカー2	294			283	263	263/283
マーカー3	365			148/217	365	148/217/365
マーカー4	136	133	133/136	-		

図1302-1　各マーカーの測定例

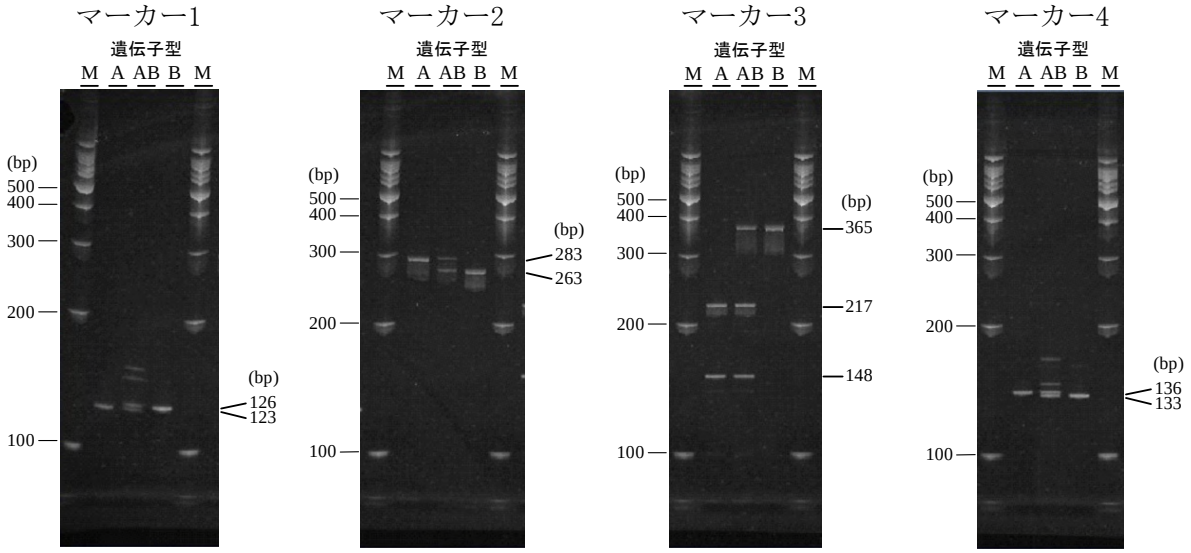


表1302-7　14機関による妥当性確認分析結果

	正答数	誤答数	棄却機関数	棄却後正答数	棄却後誤答数
マーカー1	334	2	1	312	0
マーカー2	336	0	0	336	0
マーカー3	336	0	0	336	0
マーカー4	335	1	0	335	1
黒毛判定	335	1	0	335	1

表1302-8　14機関による分析方法の妥当性の指標

	感度	特異性	偽陽性率	偽陰性率
マーカー1	1.00	1.00	0.00	0.00
マーカー2	1.00	1.00	0.00	0.00
マーカー3	1.00	1.00	0.00	0.00
マーカー4	1.00	0.99	0.01	0.00
黒毛判定	1.00	0.99	0.01	0.00

(オ) 改良した方法について、AOAC オフィシャルメソッドアナリシス（Appendix D、Appendix R）の参照法による定性試験の妥当性確認法に沿った、14機関による共同試験を実施した。各機関には24点のブラインド試料と標準試料等を送付した。妥当性の確認は、各マーカーについて行うこととし、さらに、分析結果をもとに黒毛和牛か否かの判定についても行った。分析結果は前回の共同試験と同様 McClure（1990）の方法によって解析した。その結果、マーカー1では棄却機関があったが、その他のマーカーでは問題がなかった。(表1302-7) 分析の妥当性を示す4つの指標（感度、特異性、偽陽性率、偽陰性率）が、各マーカーとも感度及び特異性で0.99以上、偽陽性率及び偽陰性率で0.01以下と非常に良好であった。(表1302-8)

エ　考　察

(ア) 検査現場での分析手法を考える場合、どこで、誰が行っても同じような結果が得られるようにすることが重要である。今回行った2回の共同試験の結果を比較すると、手法をより単純化したほうが、分析方法の能力を示す指標が良好になっており、手法をより単純化したほうが、現場への導入が容易なことが推察される。

(イ) 分析の妥当性を示す4つの指標（感度、特異性、偽陽性率、偽陰性率）は、各マーカーとも感度及び特異性で0.99以上、偽陽性率及び偽陰性率で0.01以下と非常に良好であったが、誤回答があったのはマーカー1とマーカー4であった。この2つのマーカーは、ともに PCR 産物の3bp の違いにより判定する方法であり、このあたりが影響した可能性がある。

オ　今後の課題

分析の手法としては、妥当性が確認されており問題となるような点はないが、実際の検査現場での使用に際しては、特許使用許諾を得る必要がある等の問題がある。

カ　要　約

牛肉の黒毛和種とホルスタイン種及び黒毛和種とホルスタイン種の交雑種について、DNA マーカーを用いた判別方法の検査現場での活用について検討した。神戸大等の開発した複数のマーカーを組み合わせる手法をマニュアル化するとともに、共同試験を実施し問題点を洗い出した。その結果をもとに手法の簡略化等を行い、マニュアルを改良した。改良したマニュアルを用いて、国際的に参照される方法である AOAC オフィシャルメソッドアナリシスの参照法に沿って定性試験の妥当性確認を行った。その結果、品種判別に用いた 4 つのマーカーで分析の妥当性を示す 4 つの指標（感度、特異性、偽陽性率、偽陰性率）が、各マーカーとも感度及び特異性で0.99以上、偽陽性率及び偽陰性率で0.01以下と非常に良好であった。

キ　引用文献

公開特許公報（A）、特開2005－27655　「牛品種の鑑別方法」

Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC International, 2002

Appendix R: Checklist for Protocol Design of Collaborative Studies, AOAC INTERNATIONL OMA Program Manual, January 2002

McCLURE, F, D 1990 Design and Analysis of Qualitative Collaborative Studies: Minimum Collaborative Program, J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM. 73(6), 953-960

研究担当者（森田正晶*、栗原秀夫）

3　安価で簡便なウシ個体識別技術の開発

ア　研究目的

食肉の安全性を保証するため、食肉の DNA マーカーによるトレーサビリティーシステムを確立する。多型性の高いマイクロサテライト（MS）やゲノム中に多数存在する一塩基多型（SNP）等の DNA マーカーを大量に開発する。得られた DNA マーカーを用いて、簡便、かつ、安価な検査手法を確立する。

イ　研究方法

(ｱ) MS 濃縮ライブラリーから多数の MS を単離してマーカーを開発し、米国農務省（USDA）標準家系を用いて、連鎖地図上にマッピングする。

(ｲ) 細菌人工染色体クローンの末端配列や遺伝子配列中の SNP を検索し、マーカーを開発する。

(ｳ) 黒毛和種とホルスタイン種の集団についてマーカーのタイピングを行い、多型性が高いと同時に、PCR 増幅が良好で、タイピングも容易であるマーカーを選別する。

(ｴ) ウシゲノムの断片塩基配列が公開されたことから（2004年10月、1st レリース）、ゲノム断片塩基配列中の MS を検索し、多型性が高いと思われる、(CA) 繰り返し数の多い MS をターゲットとして特異性の高いプライマーを設計する。これらについても、黒毛和種とホルスタイン種でマーカーのタイピングを行い、多型性等を確認する。

(ｵ) 上記(ｳ)と(ｴ)を用いて、簡便かつ精度よく検査のできるマーカーセットを構築する。

ウ　研究結果

(ｱ) MS 濃縮ライブラリーを用いた MS の開発と連鎖地図へのマッピング

MS 濃縮ライブラリーより単離した MS から、最終的に1696個の MS を Shirakawa-USDA ウシ連鎖地図にマッピングした（図1303-1）。

(ｲ) SNP マーカーの開発

ウシゲノム上の特定領域について、細菌人工染色体クローンの末端配列や遺伝子から約40個の SNP マーカーを開発した。

(ｳ) 多型性の高い MS マーカーの選別

MS は SNP より多型性が高いので、少ない数のマーカーで個体識別が可能である。そこで、MS を用いた検査法を確立することにした。(ｱ) で構築した Shirakawa-USDA ウシ連鎖地図上の3800個の MS より、マッピングに用いた標準家系において多型性の高

かったMSを染色体毎に3～6個（計150個）選んだ。これらについて、黒毛和種とホルスタイン種、各96頭をジェノタイピングし、多型性が高いと同時に、PCR 増幅が良好で、タイピングも容易であるマーカーの選別を行った。その結果、黒毛和種とホルスタイン種のどちらの集団においてもヘテロ率0.7以上のものが19個、うち、異なる染色体上にあるものが15個得られた。

（ｴ）公開されたウシゲノム断片塩基配列を用いたMSマーカーの開発

公開されたウシゲノム断片塩基配列には、（CA）の繰り返し数が9以上のMSが、約38000個あることがわかった。（ｳ）で選別したマーカーを補足するために、これらのマーカーとは異なる4本の染色体について、ゲノム断片塩基配列を用いて、44個のマーカーを開発した。このうち、予備試験において多型性が高いと考えられた7マーカーについて、黒毛和種とホルスタイン種における多型性を調べた。その結果、（ｳ）で選別したマーカーと同等以上の多型性を持つ5マーカーが得られた。

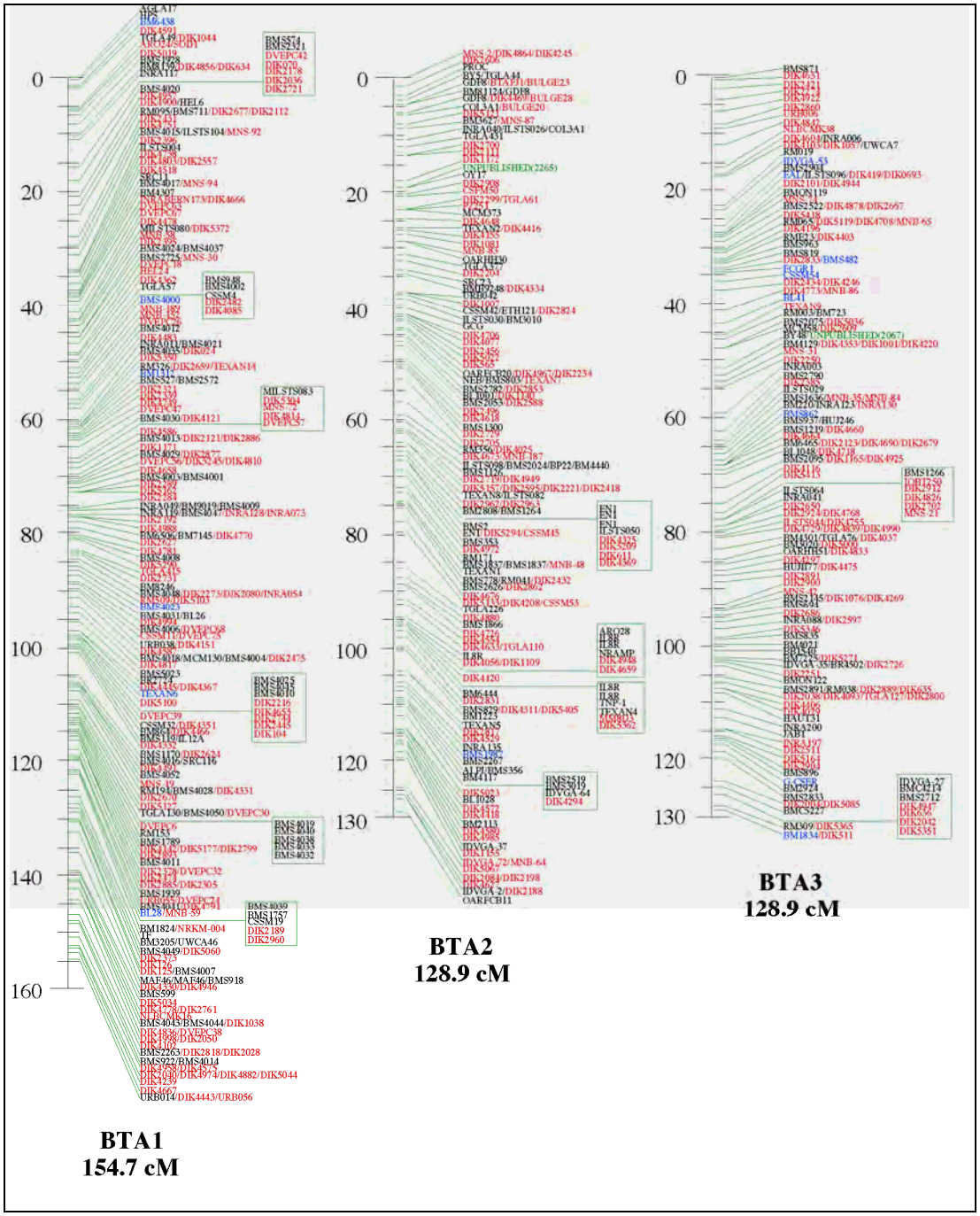


図1303-1　MSの開発とShirakawa-USDAウシ連鎖地図の作成（第1番から第3番染色体を例として示す）

(オ) MS マーカーセットの構築と検査法の確立

a　国際標準化マーカーの父子鑑定判別率

現在、ウシの個体識別には、国際標準化マーカーとして設定された9MS マーカーが用いられている。したがって、国際標準化マーカーでの判別率を対照として、より高い判別率を持つマーカーセットを構築することにした。国際標準化マーカーの判別率を算出するために、(ウ)、(エ)で用いた黒毛和種とホルスタイン種（各96頭）を国際標準化マーカーでタイピングした。この際、国際標準化マーカーのひとつである INRA023マーカーは、PCR 増幅が悪く、除外せざるを得なかった。残りの 8 マーカーで得られる父子鑑定判別率は、黒毛和種0.9309、ホルスタイン種0.9697と算出された（表1303-1)。

b　新しいマーカーセットの構築

(ケ)、(ヱ)の結果を基に、PCR 増幅が良好でタイピングの容易なマーカーの中から、(1)異なる染色体に位置し、(2)多型性が高く、(3) 3 種類の蛍光色素により同時に解析できる（同じ蛍光色素で標識されたマーカーのアリルサイズの範囲が重ならない)、8 または 9 マーカーを選択した。

c　新しいマーカーセットによる検査法の確立

上記において、3 蛍光色素を用いることにより、PCR 反応後、1 レーンの電気泳動で解析できるマーカーセットを設定した。が、より簡便な検査法としては、PCR 反応自体を 1 反応で行えることが望ましい。複数マーカーのマルチプレックス PCR は、マーカー数が多くなるほど、加えるプライマーの種類が増えるので、予期せぬ副産物ピークを生じ、また、そのために本来のマーカー部位の増幅が損なわれやすくなる。これを、マーカーの組み合わせから予測することは困難であるので、数マーカー毎に組み合わせてマルチプレックス PCR を行い、各マーカーの増幅が損なわれない組み合わせを選び出した。最終的に、1 反応で PCR 増幅のできる 8 マーカーからなるマーカーセットを構築した（図1303-2)。

d　国際標準化マーカーの父子鑑定判別率との比較

本研究で得られた 8 マーカーの父子鑑定判別率は、黒毛和種で0.9918、ホルスタイン種で0.9923と算定され、それぞれ国際標準化マーカーの判別率（黒毛和種0.9309、ホルスタイン種0.9697）を上回った（表1303-1)。

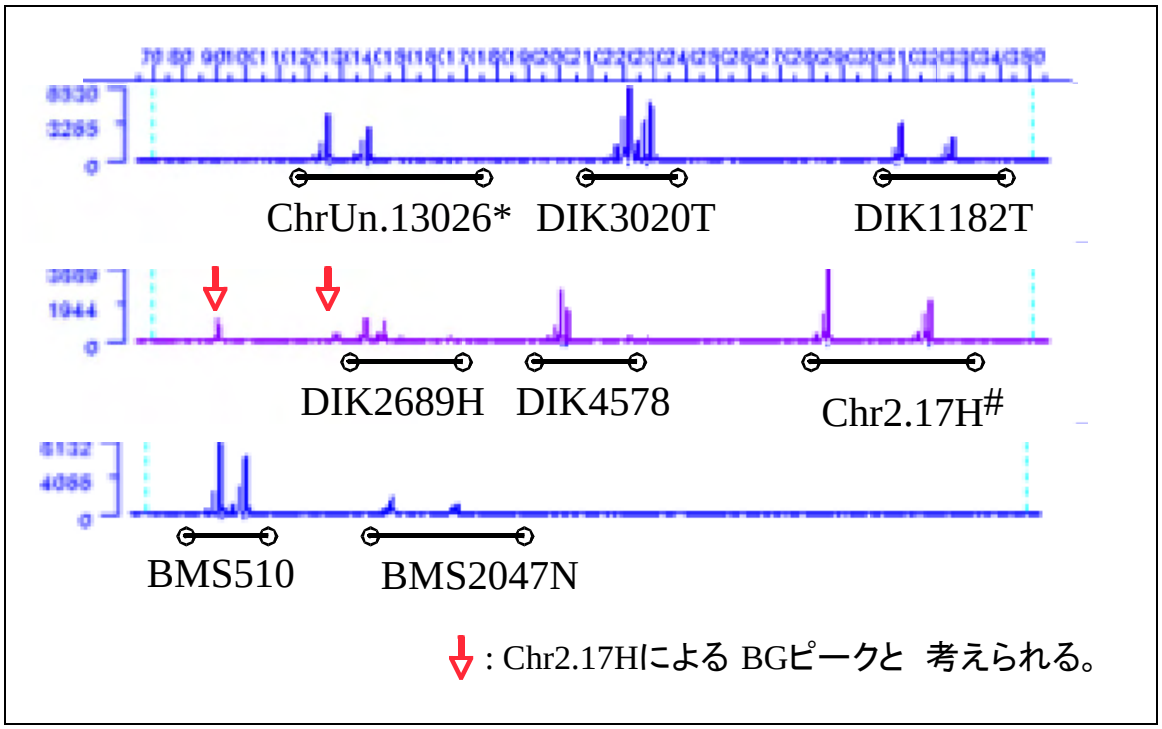


図1303-2　構築した8MS マーカーセットのアリルパターン

表1303-1　国際標準化マーカーとの比較

ホルスタイン種

	今年度8MS	国際標準化マーカー (INRA023を除く8MS)
アリル数	10-12	5-12
ヘテロ率	0.73-0.89	0.58-0.88
父子鑑定判定率	0.9923	0.9697

黒毛和種

	今年度8MS	国際標準化マーカー (INRA023を除く8MS)
アリル数	9-16	4-8
ヘテロ率	0.69-0.90	0.47-0.82
父子鑑定判定率	0.9918	0.9309

エ　考　察

(ｱ) MS 濃縮ライブラリーを用いた MS の開発と連鎖地図へのマッピング

MS 濃縮ライブラリーを用いて、ゲノム全体から MS マーカーをランダムに開発し、連鎖地図にマップした意義は大きい。Shirakawa-USDA ウシ連鎖地図上の MS は、計3802個となり、本研究で開発した MS が、この44%を占める。連鎖地図の高密度化によって、個々の研究者が独自に MS マーカーを開発する労力と費用が大きく削減された。ウシゲノム配列決定プロジェクトにも大きく貢献することができた。

(ｲ) 多型性の高い MS マーカーの選別とマーカーセットの構築

Shirakawa-USDA 連鎖地図上の MS から多型性の高い MS マーカーを選別し、これらから 9 マーカーを選んでマーカーセットとした。このセットは、1 レーンの電気泳動で解析できるが、1 本のチューブ内で同時増幅を行うと、マーカーアリルのピークの S/N 比が下がるなどの問題が生じた。これを解決するには、多型性の高い他 MS との置換が必要であったが、開発の経緯より、既知 MS では無理と考えられた。その当時、米国を中心とするウシゲノム配列決定プロジェクトにより、大量のウシゲノム断片配列が公開されたので、これを利用して新規 MS マーカーの開発を行うことにした。

(ｳ) 公開されたウシゲノム断片塩基配列を用いた MS マーカーの開発と検査法の確立

公開されたウシゲノム断片塩基配列には、新規 MS が多数含まれ、これまでのノウハウを生かしたプライマー設計により、容易に MS マーカーを開発できることがわかった。(ｲ)のマーカーセットを補完できるよう、多型性が高いと思われる(CA)繰り返し数の多い新規 MS について、マーカー開発を行い、最終的に、1 反応で PCR 増幅のできる 8 マーカーからなるマーカーセットを構築することができた。また、父子鑑定判別率についても、黒毛和種、ホルスタイン種ともに、現在使用されている国際標準化マーカーの判別率を大きく上回ることができた。

オ　今後の課題

(ｱ) 検体数を増やして、構築したマーカーセットの安定性、判別性等について、さらに確認する。

カ　要　約

(ｱ) MS 濃縮ライブラリーを用いた MS の開発と連鎖地図へのマッピング

MS 濃縮ライブラリーより単離した MS から、最終的に1696個の MS を Shirakawa-USDA ウシ連鎖地図にマッピングした。

(ｲ) SNP マーカーの開発

ウシゲノム上の特定領域について、細菌人工染色体クローンの末端配列や遺伝子から約40個の SNP マーカーを開発した。

(ｳ) 多型性の高い MS マーカーの選別

Shirakawa-USDA ウシ連鎖地図上の MS 計150個を、黒毛和種とホルスタイン種（各96頭）でジェノタイピングし、どちらの集団においてもヘテロ率0.7以上のもの19個、うち、異なる染色体上にあるもの15個を得た。

(ｴ) 公開されたウシゲノム断片塩基配列を用いた MS マーカーの開発

公開されたウシゲノム断片塩基配列を用いて新規 MS マーカーを開発し、(ｳ)で選別したマーカーと同等以上の多型性を持つ5マーカーを得た。

(ｵ) MS マーカーセットの構築と検査法の確立

a　国際標準化マーカーの父子鑑定判別率

現在ウシの個体識別に用いられている国際標準化マーカーの父子鑑定判別率は、黒毛和種0.9309、ホルスタイン種0.9697であった。

b　新しいマーカーセットの構築

選別した MS マーカーの中から、(1)異なる染色体に位置し、(2)多型性が高く、(3) 3種類の蛍光色素により同時に解析できる（同じ蛍光色素で標識されたマーカーのアリルサイズの範囲が重ならない)、8または9マーカーを選択した。

c　新しいマーカーセットによる検査法の確立

1反応で PCR 増幅のできる8マーカーからなるマーカーセットを構築した。

d　国際標準化マーカーの父子鑑定判別率との比較

本研究で構築した8マーカーの父子鑑定判別率は、黒毛和種で0.9918、ホルスタイン種で0.9923であり、それぞれ国際標準化マーカーの判別率を大きく上回った。

研究担当者（杉本喜憲*、高須賀晶子、渡邊敏夫、平野　貴、井原尚也、横内　耕）

4　毛色遺伝子を利用したブタ品種識別技術の開発

ア　研究目的

ブタの品種を識別する際に、毛色関連遺伝子の多型検出は有効な手段である。現在、ブタでは3遺伝子で毛色形質との関係が示されているが、その他の遺伝子では明らかとなっていない。本課題では、網羅的に毛色関連遺伝子の配列を解析し、検出された多型をブタ品種の識別やトレーサビリティ・システムの構築に応用することを目的とする。

イ　研究方法

(ｱ) PEDE(Pig EST data explorer)を用いた毛色関連遺伝子の cDNA クローン検索

PEDE により完全長 cDNA ライブラリを検索し、毛色関連遺伝子を含むクローンを抽出し、その配列を決定する。

(ｲ) ブタ品種参照 DNA パネルの作製

複数のブタ品種について、その多型性を解析するための DNA を収集し、参照パネルとする。少なくとも200個体以上の収集を行い、192個体分にての DNA パネルとする。

(ｳ) RT-PCR による毛色関連遺伝子の増幅、配列決定と SNPs 抽出

blast 検索により、これまでブタで明らかとなっていない毛色関連遺伝子について PCR 用のプライマーを作製する。cDNA の作製には、複数のブタ品種の皮膚、腎臓、および網膜から抽出したmRNA を用いる。RT-PCR により増幅した配列を確定し、SNPs を抽出する。

(ｴ) 飛行時間型質量分析計(TOF-MS)による各ブタ品種の多型調査

SEQUENOM 社製の TOF-MS を用い、主にアミノ酸置換を生じる SNP 遺伝子座の多型検索を、ブタ品種参照 DNA パネルを用いて行う。

(ｵ) その他

毛色関連遺伝子以外で、母系のマーカーとなるミトコンドリア DNA(mtDNA)の多型を銘柄豚で解析する。

ウ　研究結果

(ｱ) PEDE により毛色関連遺伝子のクローンを検索し、5’末端側の配列が一番長いクローンから DNA を抽出し、塩基配列を決定した（26遺伝子で各1クローンずつ）（表1304-1)。

表1304-1　決定したcDNAクローンと毛色関連遺伝子

full は完全長クローン、partial は完全長でないクローン、splice var. はスプライスバリアントを示す。

Gene	cDNA clone		Gene	cDNA clone	
HPS4	MLN01_0087_F12	full	*ADAM17*	ITT01_0085_E07	partial
HPS5	AMP01_0056_A01	full	*BRCA1*	OVRM1_0133_G12	partial
HPS6	SPL01_0012_C10	full	*EDN3*	OVRM1_0193_B12	splice var.
LYST	THY01_0032_C11	partial	*IKBKG*	TCH01_0037_H11	splice var.
MU	THY01_0123_H02	full	*KRT2A*	THY01_0032_B05	partial
PLDN	ITT01_0065_D11	full	*MCOLN3*	OVR01_0059_B12	splice var.
RABGGTA	OVRM1_0197_E02	full	*SFXN1*	LVR01_0067_G10	full
VPS33A	THY01_0031_F12	splice var.	*SOX18*	OVR01_0044_D09	full
MLPH	TCH01_0007_B07	splice var.	*GPNMB*	AMP01_0008_D03	full
MYO5A	OVRM1_0067_B01	partial	*AP3B1*	AMP01_0001_E03	partial
RAB27A	UTR01_0003_A12	full	*AP3D1*	LNG01_0068_B07	partial
GGT1	OVRM1_0105_F11	splice var.	*DTNBP1*	LNG01_0043_F03	splice var.
ATP7B	LNG01_0069_E09	partial	*HPS3*	AMP01_0018_F09	partial

(ｲ) ブタ品種参照DNAパネルの作製

品種別のSNP遺伝子座の多型性を評価するために、11品種192個体（日本イノシシを含む）の参照DNAパネルを作製した。用いた品種と個体数は、ランドレース16、大ヨークシャー31、中ヨークシャー６、デュロック32、バークシャー34、ハンプシャー20、梅山豚32、金華豚12、ポットベリー３、クラウンミニ１、日本イノシシ５である。

(ｳ) RT-PCRによる毛色関連遺伝子の増幅、配列決定とSNPs抽出

a　毛色に関与するメラニン合成系を主な対象とした10個の遺伝子について、ブタ８個体のcDNAで各々PCRを行い、その配列を確定しSNPsを抽出した（文献1、2）。この過程で、金華豚に特異的な*EDNRB*遺伝子の変異(Pro64Ser、金華豚ではSer)を検出した。ブタ品種参照DNAパネルを用い多検体で確認したところ、金華豚に特異的な変異であることが判明したので、この部位を検出することのできるPCR-RFLPの系を作製した（写真1304-1）。

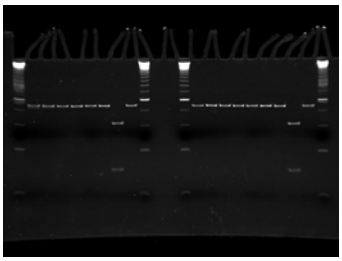


写真1304-1 制限酵素、*Bsm*AIを用いたPCR-RFLP(右)金華豚が83bpと29bpの２本、その他の豚は112bpの１本となる。

b　これまでブタで多型検索がなされていない毛色関連の44遺伝子についてPCR用のプライマーを作製した。39遺伝子について目的産物の増幅を確認し、28遺伝子の配列を確定、SNPsを検索した(表1304-2)。なお、PCRには８個体の組織を１つにまとめて抽出したcDNAを用いた。

表1304-2　決定した塩基長(bp)と SNPs の数

Gene	length(bp)	SNPs	Gene	length(bp)	SNPs
EDN3	899	4	*HPS4*	2,584	1
EGFR	3,666	8	*HPS5*	3,418	2
IKBKG	2,316	3	*HPS6*	2,555	2
KRT2A	2,086	1	*MU*	602	1
MCOLN3	751	0	*PLDN*	734	0
SFXN1	1,041	1	*RABGGTA*	1,805	0
SNAI2	795	0	*VPS33A*	1,872	0
SOX10	1,754	0	*GGT1*	1,816	5
GPNMB	1,718	2	*BCL2*	728	0
AP3D1	4,546	7	*ATRN*	3,963	0
BLOC1S3	729	3	*MGRN1*	1,644	1
DTNBP1	891	2	*ATP7A*	3,979	0
HPS1	2,214	1	*ATP7B*	3,621	10
HPS3	3,046	5	*ERCC2*	2,182	2

表1304-3　3 遺伝子の TOF-MS による多型調査

KIT、*KITLG* および *MC1R* 遺伝子の TOF-MS によるブタ品種 SNP s 検索
3遺伝子（*KIT*、*KITLG*、*MC1R*）の制御領域の一部およびコード領域の非同義置換部位に TOF-MS 用のプライマーを設計

検索部位	*KIT*	*KITLG*	*MC1R*	
制御領域	2	4	0	（箇所）
コード領域	6	1	6	（箇所）

	KIT exon○ Lys○Arg	*KIT* exon○ Ala○Val	*KITLG* Thr○Ala
東洋ブタ	Lys	Ala	Ala
西洋ブタ	Lys/Arg	Ala/Val	Thr/Ala
	バーク Lys	ハンプ Ala	バーク Ala (30/32)

○は論文執筆中のため、エキソン番号等を公表しない。

(ｴ) 飛行時間型質量分析計(TOF-MS)による各ブタ品種の多型調査

TOF-MS を用い、主にアミノ酸置換を生じる *MC1R*、*KIT* および *KITLG* 遺伝子の SNPs をブタ品種別に調査した。*MC1R* ではこれまで明らかにされた毛色形質と変異が一致した。*KIT* 遺伝子では、バークシャー種およびハンプシャー種で東洋ブタのタイプとなっている箇所がそれぞれ存在した（表1304-3）。

(ｵ) その他

毛色遺伝子以外では、静岡県銘柄豚の基礎豚となる大ヨークシャー種(フジヨーク)の mtDNA 多型によるトレーサビリティ・システムを確立した（文献３）。

エ　考　察

(ｱ) PEDE(Pig EST data explorer)を用いた毛色関連遺伝子の cDNA クローン検索

PEDE を活用し、現在マウスでクローニングされている毛色関連遺伝子をすべて検索した。検出した26個は、これまで知られている毛色関連遺伝子の1/4程度の数である。

(ｲ) ブタ品種参照 DNA パネルの作製

サンプルは主に購入した精液と、各県の畜産試験場関係者の好意でいただいたものである。収集したブタ11品種の DNA で192個体からなる参照 DNA パネルを作製できた。

(ｳ) RT-PCR による毛色関連遺伝子の増幅、配列決定と SNPs 抽出

a　毛色に関与するメラニンの合成系を主な対象とした10個の遺伝子を検出する過程で、金華豚に特

異的な *EDNRB* 遺伝子の変異(Pro64Ser、金華豚ではSer；文献２)を検出した。金華豚は頭部と臀部が黒色で、その他の体幹部は白色である。*EDNRB* 遺伝子は、神経冠細胞がメラニン色素を作るメラニン細胞への分化に関与するため、その変異によって、マウスでも似たような毛色パターンを示す系統が存在する。なお、*EDNRB* 遺伝子以外では、品種特異的な変異を検出できなかった。

b　blast 検索により、これまでブタで明らかとなっていない毛色関連遺伝子について PCR 用のプライマーを作製した。これらの遺伝子についてプライマーを整備し、RT-PCR とシークエンシングによって、60個以上の SNP 遺伝子座を抽出することができた。近年ゲノム情報の充実とともに、プライマーの作製が容易となってきた。

(ｴ) 飛行時間型質量分析計(TOF-MS)を用いた各ブタ品種での多型調査

TOF-MS を用い、よく知られた *MC1R*、*KIT* および *KITLG* 遺伝子の主にアミノ酸置換を生じる SNPs をブタ品種別に調査した。検出可能な全ての SNP 遺伝子座の調査の結果、品種に特徴のある遺伝子座が判明した。つまり、１つの遺伝子について、なるべく多くの SNP 遺伝子座の多型調査が望ましいという結論となった。

(ｵ) その他

県銘柄豚の基礎豚の mtDNA 多型調査で、母系のマーカーとなることが確認された。

オ　今後の課題

(ｱ) PEDE(Pig EST data explorer)を用いた毛色関連遺伝子の cDNA クローン検索

完全長を含む26遺伝子の配列を決定したが、未だ判明していない配列も多い。これまでマウスで判明した毛色に関する遺伝子を網羅するには、発生段階の cDNA ライブラリを作製する必要もあるが、ブタで発生日齢別のライブラリ作製は困難である。とりあえず26遺伝子を抽出できたことは、一定の成果であると考える。

(ｲ) ブタ品種参照 DNA パネルの作製

11品種192個体からなる参照 DNA パネルを作製することができたが、ブタの集団の大きさを考慮すると、更に参照 DNA を増やす必要がある。今後は96穴プレート４枚分の384個体参照 DNA パネルを作製する予定である。

(ｳ) RT-PCR による毛色関連遺伝子の増幅、配列決定と SNPs 抽出

まずはメラニン合成系を中心に、８個体の cDNA を用いて配列を決定したが、各々配列を増幅、決定するには労力と研究費の負担が大きい。そのため、８個体の mRNA をまとめて抽出し、RT-PCR を行った。SNP 遺伝子座は28遺伝子で60個以上抽出することができたが、完全に多型を抽出できたかは判らないため、やはり個別に増幅し、配列比較すべきであったと考える。プライマーは整備されたので、改めて個体別に確定していく予定である。

(ｴ) 飛行時間型質量分析計(TOF-MS)を用いた各ブタ品種での多型調査

試みに３遺伝子の SNP 遺伝子座の多型調査を行ったが、網羅的に解析した結果、特徴のある遺伝子座が検出されている。今後も遺伝子ごとになるべく多くの SNP 遺伝子座の多型解析を行う必要がある。

(ｵ) その他

mtDNA の多型は、銘柄豚や造成豚の母系マーカーとして有効であることが確認された。今後はハプロタイプとして解析し、指標となる SNP 遺伝子座をセット化する必要がある。

カ　要　約

(ｱ) PEDE(Pig EST data explorer)を用いた毛色関連遺伝子の cDNA クローン検索

完全長を含む毛色関連遺伝子26個の配列を決定した。

(ｲ) ブタ品種参照 DNA パネルの作製

ブタ11品種192個体からなる参照 DNA パネルを作製した。

(ｳ) RT-PCR による毛色関連遺伝子の増幅、配列決定と SNPs 抽出

a　毛色に関与するメラニンの合成系を主な対象とした10個の遺伝子の配列を新規に確定した。この過程で、金華豚に特異的な *EDNRB* 遺伝子の変異(Pro64Ser、金華豚では Ser)を検出した。

b　blast 検索により、これまでブタで明らかとなっていない毛色関連遺伝子について RT-PCR 用のプライマーを作製した。28個の遺伝子についてプライマーを整備し、60個以上の SNP 遺伝子座を抽出することができた。

(ｴ) 飛行時間型質量分析計(TOF-MS)を用いた各ブタ品種での多型調査

3遺伝子(*MC1R*, *KIT*, *KITLG*)のSNP遺伝子座の多型調査を行った。その結果、品種に特徴のある遺伝子座が検出された。

(オ) その他

静岡県銘柄豚の母系基礎豚となるフジヨークのmtDNA多型によるトレーサビリティ・システムを確立した。

キ　引用文献

N Okumura, T Hayashi, H Sekikawa, T Matsumoto, A Mikawa, N Hamasima, T Awata 2005.

Sequences and mapping of genes encoding tyrosinase (TYR) and tyrosinase related proteins (TYRP1 and TYRP2). Animal Genetics. 36:513-516.

N Okumura, T Hayashi, H Sekikawa, T Matsumoto, A Mikawa, N Hamasima, T Awata 2005.

Sequencing, mapping and nucleotide variation of porcine coat colour genes *EDNRB*, *MYO5A*, *KITLG*, *SLC45A2*, *RAB27A*, *SILV* and *MITF* 2006. Animal Genetics. 37:80-82.

井手華子、堀内篤、知久幹夫、寺田圭、奥村直彦 2005. ミトコンドリアDNA・非コード領域の多型による系統豚「フジヨーク」の母系解析. 日本養豚学会報 42(3):130-138.

研究担当者（奥村直彦*、松本敏美、上西博英）

5　品種・個体識別に有用なDNAマーカーの開発

ア　研究目的

消費者の食の安全性に対する意識が年々高まっている中で、食品の来歴を明らかにすることができる技術（トレーサビリティ）の開発が望まれている。現在、市場のブタ肉の品種検査には1塩基多型(SNP)を用いた品種判別技術が用いられているが、SNPは数百塩基に1個存在するため、そのモニタリングによって、様々な品種や個体を遺伝的変異によって判別し、分類することが期待される。本課題において、ブタEST解析によって作成されたデータベースを利用し、アライメントによって効率的にSNPsを抽出するとともに、品種・個体におけるSNPsの分布及び頻度を検出し、様々な品種・個体の識別に対応できるDNAマーカーの開発を目指す。

イ　研究方法

(ア) 西洋ブタ発現遺伝子タグ配列(EST)と比較のための東洋ブタ(梅山豚)のEST解析

産業基幹西洋ブタのESTとの比較によりSNPを抽出するため、遺伝的に離れた東洋ブタ(梅山豚)のcDNAライブラリを構築、ESTを収集し、PEDE(Pig EST data explorer)においてデータベース化し、比較した。

(イ) ブタ品種参照DNAパネルの作製

複数のブタ品種について、その多型性を解析するためのDNAを収集し、参照パネルとする。少なくとも200個体以上の収集を行い、192個体分にてのDNAパネルとする。

(ウ) データベースでのSNP遺伝子座の抽出と、飛行時間型質量分析計(TOF-MS)を用いた多型検出のためのプライマー作製

PEDEにより、ESTのクラスタリングとアライメントにより得られた塩基配列情報からSNP遺伝子座を抽出する。SNP遺伝子座を挟んで前後30塩基程度以上が得られる同一エキソン内にある配列を検索し、TOF-MSでの検出用プライマーを作製する。

(エ) 飛行時間型質量分析計(TOF-MS)を用いた、各ブタ品種での多型調査

SEQUENOM社製のTOF-MSを用い、新規に作製した192個体から構成される参照DNAパネルについて、ブタ品種での多型調査を行う。

(オ) ブタ品種内・品種間での多型性評価とトレーサビリティに有効な遺伝子座の抽出

SNPの検出結果から各種の統計的指標を算出し、ブタ品種内・品種間の多型性を評価する。また、各対立遺伝子の頻度から遺伝距離を計算し系統樹を作成するとともに、主成分分析によって各品種の遺伝的類縁関係を示す。

(カ) その他

より効率的なSNP遺伝子座の開発のため、EST情報を活用した塩基配列をブタ品種別に決定し、アライメントによりSNPの抽出を試みる。

ウ　研究結果

(ア) 西洋ブタ発現遺伝子タグ配列(EST)と比較のための東洋ブタ(梅山豚)のEST解析

梅山豚の肝臓および卵巣から作製したcDNAクローンを用い、主に5'末端から塩基配列を解読した。肝臓では19,572クローン、卵巣では20,735クローン

の EST を登録した。

(ｲ) ブタ品種参照 DNA パネルの作製

品種別の SNP 遺伝子座の多型性を評価するために、11品種192個体（日本イノシシを含む）の参照 DNA パネルを作製した。用いた品種と個体数は、ランドレース16、大ヨークシャー31、中ヨークシャー６、デュロック32、バークシャー34、ハンプシャー20、梅山豚32、金華豚12、ポットベリー３、クラウンミニ１、日本イノシシ５である。

(ｳ) データベースでの SNP 遺伝子座の抽出と、飛行時間型質量分析計(TOF-MS)を用いた多型検出のためのプライマー作製

梅山豚と西洋ブタ品種の EST の比較により、348個の SNP 遺伝子座が検出された。また、その両方に多型のある遺伝子座は77個であった(表1305-1)。

表1305-1 EST のアライメントにより抽出した SNP の数　梅山豚の配列により検索されたもののみを表示

	西洋ブタと梅山豚間に検出	西洋ブタと梅山豚の両方に検出	合計
同義置換	285	56	341
非同義置換	63	21	84
合計	348	77	425

ここで、SNP 遺伝子座を挟んで前後30塩基程度以上が得られる同一エキソン内にある配列を検索し、TOF-MS での検出用プライマーを作製した。その結果、西洋ブタと梅山豚間で104遺伝子座についてプライマーを作製できた。更に西洋ブタ内で検出された SNP から、118遺伝子座でプライマーを作製できたため、合計222遺伝子座(222セット)となった。

(ｴ) 飛行時間型質量分析計(TOF-MS)を用いた、各ブタ品種での多型調査

SEQUENOM 社製の TOF-MS を用い､新規に作製した192個体から構成される参照 DNA パネルについて多型を調査した。上記222遺伝子座で192遺伝子座のデータを取得できた。

(ｵ) ブタ品種内・品種間での多型性評価とトレーサビリティに有効な遺伝子座の抽出

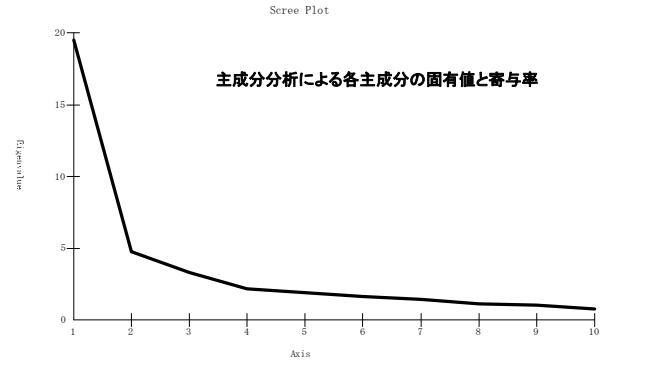
SNP の検出結果から各種の統計的指標を算出した。表1305-2の対角線上は Nei の遺伝距離､対角線下はブタ品種間の Fst 値を示す。どちらの値も数値が小さいほど遺伝的に近縁であることを示す。これらの統計値から、品種間ではランドレース種とバークシャー種が近縁で、ハンプシャー種と梅山豚が遺伝的に最も離れていた。なお、表1305-2のブタ品種表記は、L:ランドレース、W：大ヨークシャー、Y：中ヨークシャー、D:デュロック、B：バークシャー、H:ハンプシャー、M:梅山豚、J：金華豚、P：ポットベリー、WB：日本イノシシ､CL：クラウンミニである。表中、クラウンミニは１個体のため Fst 値を計算していない。

表1305-2 ブタ品種間での Nei の遺伝距離（対角線上）と Fst 値（対角線下）

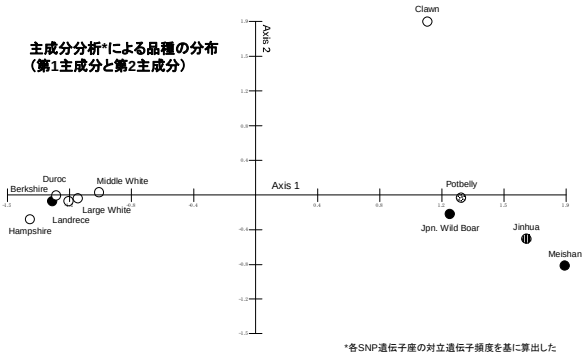
	L	W	Y	D	B	H	M	J	P	WB	CL
L		0.065	0.080	0.098	0.065	0.085	0.508	0.398	0.328	0.338	0.357
W	0.161		0.070	0.100	0.080	0.090	0.489	0.382	0.313	0.332	0.343
Y	0.211	0.221		0.116	0.070	0.110	0.436	0.353	0.314	0.337	0.312
D	0.242	0.289	0.239		0.087	0.103	0.532	0.435	0.355	0.367	0.374
B	0.157	0.226	0.175	0.274		0.076	0.502	0.416	0.349	0.364	0.362
H	0.245	0.302	0.250	0.358	0.282		0.553	0.455	0.368	0.381	0.424
M	0.658	0.660	0.622	0.711	0.680	0.741		0.126	0.181	0.235	0.300
J	0.588	0.602	0.586	0.665	0.635	0.698	0.432		0.124	0.157	0.243
P	0.532	0.575	0.487	0.564	0.583	0.581	0.175	0.287		0.164	0.204
WB	0.551	0.599	0.545	0.631	0.623	0.651	0.545	0.441	0.349		0.252

これらの距離行列から近隣結合法にて系統樹を作成した結果、Nei の遺伝距離および Fst 値ともに西洋ブタ品種と東洋ブタ品種（日本イノシシ、ミニブタを含む）がそれぞれ別の大きなクラスターを形成した。

次に SNP 遺伝子座における遺伝子頻度から主成分分析を行い、各品種の関係を空間に示した（図1305-1）。第 1 主成分では、西洋ブタ品種と東洋ブタ品種（日本イノシシ、ミニブタを含む）が分離した。また、寄与率は低いが、第 8 と第 9 主成分によって、白色品種やバークシャー種が分離したため、これらの分散に大きく寄与する遺伝子座を抽出した。



	Axis 1	Axis 2	Axis 3	Axis 4	Axis 5	Axis 6	Axis 7	Axis 8	Axis 9	Axis 10
Eigenvalues	19.494	4.731	3.293	2.173	1.877	1.613	1.428	1.105	1.029	0.763
Percentage	51.976	12.613	8.780	5.794	5.003	4.301	3.807	2.947	2.744	2.034
Cum. Percentage	51.976	64.589	73.369	79.163	84.166	88.468	92.275	95.222	97.966	100.000



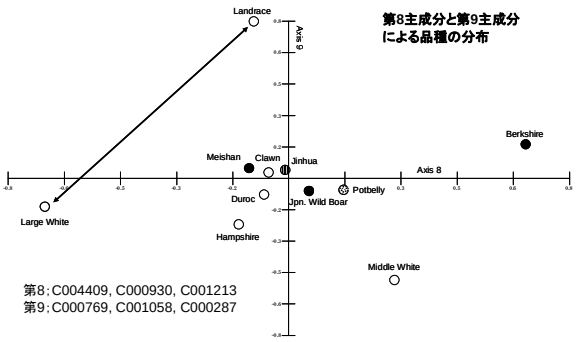


図1305-1　主成分分析による各品種の関係
第 1 主成分の寄与率が最も高く、第 5 主成分までで累積寄与率が80%を超える。第 8 と第 9 主成分の分散へ寄与する上位 3 遺伝子座を（C）に示した。

(カ) その他

EST 情報を基にプライマーを作製し、ゲノム DNA の PCR によって増幅した配列を決定し、SNP 遺伝子座を抽出した。50遺伝子座を新規に確定することができた。

エ　考　察

(ア) 西洋ブタ発現遺伝子タグ配列(EST)と比較のための東洋ブタ(梅山豚)の EST 解析

梅山豚の肝臓および卵巣から 4 万個あまりの EST を登録できたことは一定の成果である。

(イ) ブタ品種参照 DNA パネルの作製

サンプルは主に購入した精液と、各県の畜産試験場関係者の好意でいただいたものである。収集したブタ11品種の DNA で192個体からなる参照 DNA パネルを作製できた。

(ウ) データベースでの SNP 遺伝子座の抽出と、飛行時間型質量分析計(TOF-MS)を用いた多型検出のためのプライマー作製

cDNA 配列のアライメントによる SNP 遺伝子座の抽出効率は、登録された配列の量と質に比例する。本研究で新規に約 4 万個の梅山豚 EST を登録したため、SNP 抽出の効率は上がった。しかし、充分な長さの同一エキソン内に SNP 遺伝子座がその中心部に無ければ、TOF-MS 検出用のプライマーを作製することはできないため、作製できたプライマーは222セットに留まった。より効率的にプライマーを作製するためのゲノム情報が必要である。

(エ) 飛行時間型質量分析計(TOF-MS)を用いた、各ブタ品種での多型調査

TOF-MS 用プライマーが作製できた222セットの内、実際のデータがとれたものが192セットであった。全てのデータが取れなかったのは、アダクトピーク（ナトリウムなどの不純物の付加によりピークがずれる）の生成などが理由に挙げられるが、データ取得率約86%は TOF-MS による検出の許容範囲である。

(オ) ブタ品種内・品種間での多型性評価とトレーサビリティに有効な遺伝子座の抽出

各品種の多型を統計的に評価した。また、系統樹

で東洋ブタ品種と西洋ブタ品種はそれぞれ別のクラスターを形成した。西洋ブタ品種で対立遺伝子が置換している SNP 遺伝子座は検出できなかったが、主成分分析でそれらを効果的に分類可能な遺伝子座を選択した。

(カ) その他

ゲノムDNAを用いたPCRによる増幅と配列決定で、効率的に SNP 遺伝子座を抽出することができた。

オ　今後の課題

(ア) 西洋ブタ発現遺伝子タグ配列(EST)と比較のための東洋ブタ(梅山豚)の EST 解析

今後、大規模に西洋ブタと東洋ブタの発現遺伝子配列の比較から SNP を検索するためには、更に臓器数等を増やして EST の登録を進める必要がある。

(イ) ブタ品種参照 DNA パネルの作製

ブタの集団の大きさを考慮すると、更に参照 DNA を増やす必要がある。今後は96穴プレート 4 枚分の384個体参照 DNA パネルを作製する予定である。

(ウ) データベースでの SNP 遺伝子座の抽出と、飛行時間型質量分析計(TOF-MS)を用いた多型検出のためのプライマー作製

同一エキソン内の中央部に SNP 遺伝子座が存在する例は少なかったため、TOF-MS検出用のプライマー作製数は222セットに留まった。今後はイントロン内の SNP 検索をゲノム PCR によって始める予定である。

(エ) 飛行時間型質量分析計(TOF-MS)を用いた、各ブタ品種での多型調査

TOF-MS による検出率は86%程度であったが、これは複数のオリゴベンダーにサンプル・プライマーの合成を依頼し、検出効率が最も良かった会社で222セットの合成を行った結果である。 9 割程度の検出率にするために、他の阻害要因の追求を試みるつもりである。

(オ) ブタ品種内・品種間での多型性評価とトレーサビリティに有効な遺伝子座の抽出

今回検出した192個の SNP 遺伝子座では、ブタ品種間での対立遺伝子の置換は検出できなかった。今後は離散的な形質を示す毛色の関連遺伝子も含めた検出システムを構築する予定である。

(カ) その他

試みにゲノム PCR と塩基配列決定により、SNP 遺伝子座は効率的に検出できた。今後はゲノムシークエンスを基にプライマーを開発し、SNP 遺伝子座を検索していきたい。

カ　要　約

(ア) 西洋ブタ発現遺伝子タグ配列(EST)と比較のための東洋ブタ(梅山豚)の EST 解析

梅山豚の肝臓および卵巣から 4 万個あまりの EST を登録した。

(イ) ブタ品種参照 DNA パネルの作製

ブタ11品種の DNA で192個体からなる参照 DNA パネルを作製した。

(ウ) データベースでの SNP 遺伝子座の抽出と、飛行時間型質量分析計(TOF-MS)を用いた多型検出のためのプライマーの作製

梅山豚と西洋ブタ品種の EST の比較により348個の SNP 遺伝子座を検出した。また、TOF-MS 検出用のプライマーを222個の SNP 遺伝子座について作製できた。

(エ) 飛行時間型質量分析計(TOF-MS)を用いた、各ブタ品種での多型調査

TOF-MS検出用プライマーを作製した222遺伝子座で、192遺伝子座のデータを取得した。

(オ) ブタ品種内・品種間での多型性評価とトレーサビリティに有効な遺伝子座の抽出

西洋ブタ品種と東洋ブタ品種がそれぞれ大きなクラスターを形成した。また、主成分分析の寄与率は低いが、白色品種やバークシャー種を分類する遺伝子座を抽出した。

(カ) その他

ゲノム PCR によって SNP 遺伝子座を新規に50個開発した。

研究担当者（松本敏美*、奥村直彦、上西博英）

6　ブタ有用 DNA マーカーのデータベースの構築

ア　研究目的

各種農産物において品種の詐称等の問題が存在し、特に畜産物については偽黒豚等の存在が社会問題となっている。また新規系統豚の開発の際に、その系統を特徴づけ、他の系統との識別を可能にすることはブランド化を支える技術として重要である。本課題においては、品種、個体の識別における SNP (Single Nucleotide Polymorphism；一塩基多型) の有用性に着目し、そのブタゲノム中における検出システムの構

築、検出された SNP のデータベースシステムを通じた検出法、各品種におけるアリルの頻度分布の提供を行い、ブタ品種・個体識別のシステム構築を図ることとした。

イ　研究方法

(ｱ) 複数のブタ品種に由来する EST（Expressed Sequence Tag；網羅的に収集した発現遺伝子の断片配列）データに基づき、クラスタリングにより SNP を検出するシステムを開発する。

(ｲ) 開発された SNP をマーカーとして利用可能とするためのプライマー、プローブ等のデータの効率的生成を行い、さらにブタ SNP データ全般を Web 上で検索・利用できるシステムを構築する。

(ｳ) cDNA 中に検出された SNP（cSNP）について、SNP の各個体での多型検証用のプライマー設計を支援し、その品種間における多型分布を検証し、データベース化を行う。

ウ　研究結果

(ｱ) ブタ EST の蓄積と SNP の開発

ブタ各種臓器を用い、完全長 cDNA ライブラリーを三元交雑種及び梅山豚について構築し、これを用いた5’側からの高品質 EST を収集した。これらを基に、PolyPhred プログラムを用いて cDNA 中に存在する多くの SNP（一塩基多型）の検出を行うことを試みた。2005年度末までに、梅山豚については卵巣・肝臓で構築した cDNA ライブラリー40,307配列、三元交雑豚からは肺胞マクロファージ、肺、肝臓、卵巣、腸間膜リンパ節、末梢血、脾臓、気管、精巣、胸腺、子宮から110,377配列を取得した（表1306-1）。一方、一部の EST クローンについては、同一コンティグ（同一の配列をまとめたもの）に所属する10個以下の cDNA クローンについて3’末端からの配列の解読も行った。これらから、5’側からの EST からは2,353個、3’側からの解析においては787個の SNP が検出された（表1306-2）。内、中国系豚である梅山豚と西洋種との間で検出された SNP は、5’側で404個、3’側で298個であった。これら SNP を組み合わせることで東洋系－西洋系等の品種の識別に利用できることが示唆された。これらの情報は、豚の EST 情報の総合データベースである Pig EST Data Explorer（PEDE、http://pede.dna.affrc.go.jp/、図1306-1）を通じて公開している（上西他、2004）。

表1306-1　ブタ各組織における EST 解析

ライブラリー名	組織	由来	クローン数	5'-EST
AMP01	肺胞マクロファージ	LWD	9,791	9,791
LNG01	肺	LWD	9,599	9,599
LVR01	肝臓	LWD	9,120	9,120
LVRM1	肝臓	梅山豚	19,572	19,572
OVR01	卵巣	LWD	9,984	9,984
OVRM1	卵巣	梅山豚	20,735	20,735
MLN01	腸間膜リンパ節	LWD	9,792	9,792
PBL01	末梢血単核球	LWD	10,028	10,028
SPL01	脾臓	LWD	9,888	9,888
TCH01	気管	LWD	9,888	9,888
TES01	精巣	LWD	10,752	10,752
THY01	胸腺	LWD	11,935	11,935
UTR01	子宮	LWD	9,600	9,600
			150,684	150,684

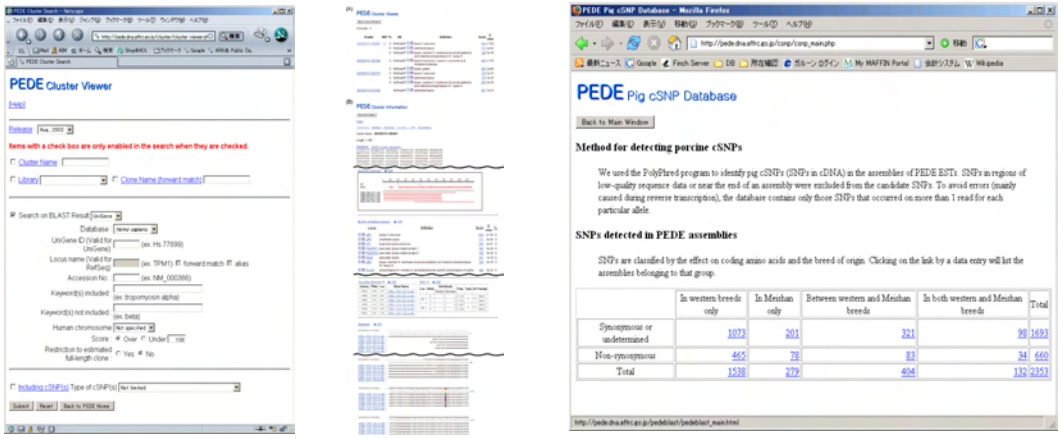


図1306-1　Pig EST Data Explorer での発現遺伝子及び SNP 情報の提供

表1306-2　EST によって検出された SNP

	西洋種内でのSNP	梅山豚内でのSNP	西洋種－梅山豚間でのSNP	西洋種、梅山豚内ともに見られるSNP	計
非同義置換	1,073	201	321	98	1,693
同義置換あるいは未同定	465	78	83	34	660
計	1,538	279	404	132	2,353
3'-UTR	298	143	298	48	787

(ｲ) SNP のマーカー化のためのプライマー、プローブ等のデータの効率的生成システムの開発

上記(ｱ)において開発を行った多数の SNP を、各ブタ個体においてそのアリルの調査を行うために、我々は質量分析計の一種である TOF-MS を用いることとした。TOF-MS を用いたアリルの決定においては、SNP 座位を挟んで PCR 増幅を行うためのプライマーの設計と、SNP 座位の判別を行う際の塩基伸張反応を行うためのプライマーの設計が必要となる。これらの設計を円滑に行うための Perl を用いたスクリプトの設計と、プライマー設計のシステム化を行った。

(ｳ) ブタにおける SNP の効率的開発手法の確立

上記(ｱ)においては、EST 等の発現遺伝子配列の内、同一の遺伝子に由来すると思われるものを並べる（アラインメント）ことにより SNP の検出を行ったが、さらに多数の SNP の開発のために、遺伝子のイントロン中に SNP を開発するための方法二つをブタにおいて試み、効率の良い開発を行い得ることについて確認した（図1306-2)。

(ｴ) cDNA 中に検出される SNP 等のブタ各品種に由来する個体におけるアリル分布の検証とデータベース化

上記において開発を行ったシステムを用い、cDNA 中に検出された SNP（cSNP）について、SNP の各個体での多型検証用のプライマー設計を支援し、その品種間における多型分布を検証し、データベース化を行った。品種間での多型情報の検証には、11の異なる品種に由来する合計96頭のブタ個体から成る DNA パネルを設計し、これらにおける SNP アリルの検討を行った。200個の SNP 座位について96個体における SNP 分布の状況の検討を行い、結果をデータベース化した。設計したデータベースは、PigSNP Database (http://pede.dna.affrc.go.jp/pigSNP/)として Web 上からのアクセスを可能とするように構築した（図1306-3)。本データベースにおいては、①品種内で多様性の高い SNP の検索・表示、② 2 品種間で多様性が高く、識別に有用と見られるマーカーの検索・表示が可能となっている。

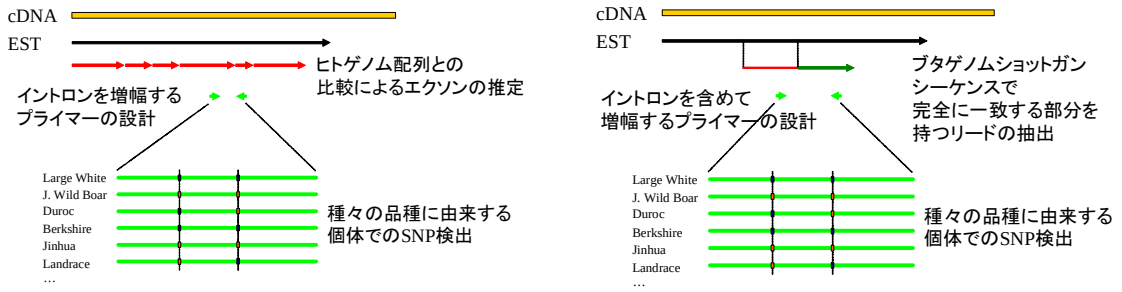


図1306-2　ブタにおける効率の良い SNP 検出のための手法開発

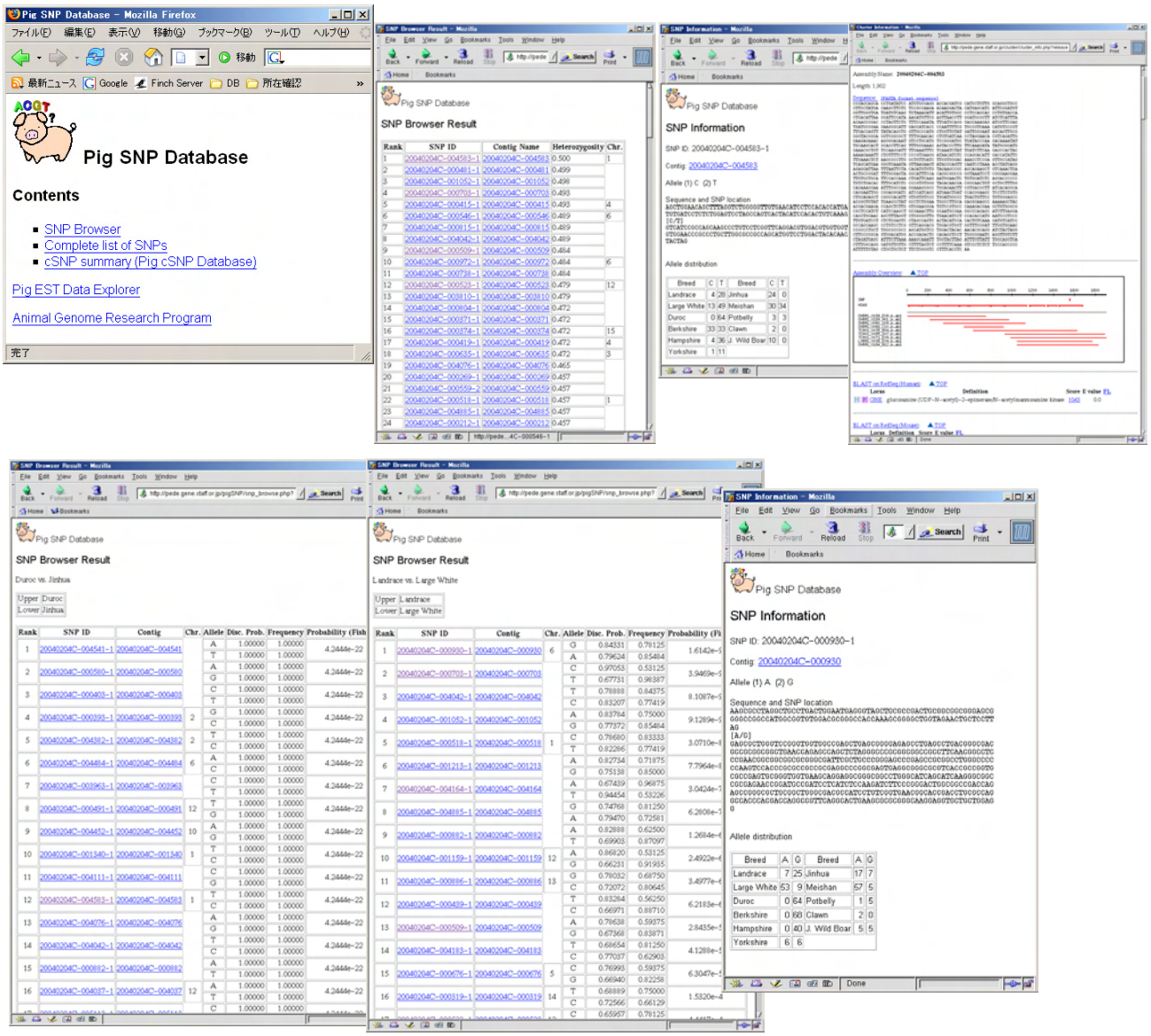


図1306-3　ブタの SNP 情報を提供するデータベース（Pig SNP Database、左上）。

本データベースにおいては、①品種内で多様性の高い SNP の検索・表示（右上）、②２品種間で多様性が高く、識別に有用と見られるマーカーの検索・表示（下）を行うことができ、同一品種内での個体識別、あるいは異なる２品種の識別に適したマーカーを選択することが可能である。

エ　考　察

(ア) ブタ EST 配列を用いた SNP の開発について

我々の所持している高品質ブタ EST は、世界でも有数のものであり、これらに基づく SNP は容易に遺伝子との対応が関係づけられるものが多く、また多くの遺伝子についてその完全解読が同時に進行中であり、SNP としての利用価値が高い。また、cSNP は、アミノ酸置換を伴うものも多く、これらは品種を特徴づける形質との相関も想定され、品種判別のための SNP として有用性が極めて高いと考えられる。これらの SNP を大量に開発し、データベース化して供給できる体制を整えたことは、今後のブタ SNP の利用に大きく資するものであると考えられる。

(イ) 多数のブタ個体における SNP のアリル分布のデータベース化について

上記(ア)のようにして開発された SNP は、実際の多数のブタ品種・個体における分布を検証することが、その有用性を高めるために必要である。200個の SNP の11品種96個体におけるアリル分布の調査結果を、Web 上から検索できるシステムを構築することにより、目的（品種内での個体識別、品種間の識別）に

応じたSNPの選択を行うことが可能となった。

オ　今後の課題

これまでに検出されたブタSNPの中から、各地において造成・維持されている銘柄豚等の「身元」の保証に役立つなど、特定のブタ集団を他と識別するために有用なSNP等のマーカーの提供に有用なデータベースの構築と維持を行うことにより、より実用的なSNPの利用が可能になるとともに、これら実用的なSNPの普及をはかることができるようになると期待される。

カ　要　約

(ｱ) 卵巣、肝臓等ブタ各種臓器を用いた完全長cDNAライブラリーにより、2,300個以上のSNPの検出を行った。これらSNPを組み合わせることで東洋系－西洋系等の品種の識別に利用できることが示唆された。

(ｲ) SNPをはじめとする各種SNPの開発、また開発されたSNPのゲノムDNAを用いた検出を行うための情報処理支援を行った。

(ｳ) EST 解析によって得られたデータに基づくcSNP及びイントロン中に存在するSNP、及び毛色関連遺伝子について、そのSNPアリル、検証するためのプライマーセット、11品種96個体におけるアリルの分布を検索できるデータベースシステムを構築した。

キ　引用文献

上西博英、江口智子、鈴木恒平、沢崎哲哉、土岐大輔、新開浩樹、奥村直彦、浜島紀之、粟田崇2004. PEDE (Pig EST Data Explorer)：construction of a database for ESTs derived from porcine full-length cDNA libraries. *Nucleic Acids Res.* 32:D484-D488.

研究担当者（上西博英*、粟田崇）

7　日本短角種の全個体認証システムの構築

ア　研究目的

消費者の食品に対する信頼を回復するため、より正確で信頼のおけるトレーサビリティシステムの開発が求められている。そのためには、全個体を厳密に管理し、その情報をデータベース化するとともに、DNA情報に基づいた客観的な判定技術が必要となるが、判定には労力や経費がかかり、生産地域で認証システムを構築するためには低コスト化が課題である。そこで、岩手県内の日本短角種集団をモデルとして、従来と比較して簡易で低コストな手法で実施できる個体判定技術を策定するとともに、その技術を導入した全個体認証システムを実証する。

イ　研究方法

(ｱ) 日本短角種全個体からのDNAサンプル採材

岩手県内において、純粋種生産を行っている日本短角種から採血によるDNAサンプルの採材を行った。採材は、各生産者の所有する牛が集合する放牧期間中を利用し、集畜時に行った。得られたサンプルは、小分けにしてID番号を付した後、使用するまで-20℃のフリーザーで凍結保存した。

(ｲ) マイクロサテライトマーカーを用いた日本短角種の個体識別技術の開発と簡易判定技術の確立

岩手県内で飼養されている日本短角種種雄牛約60頭より、それぞれの血縁の遠い牛12頭を抽出し、モデル集団とした。アメリカ農務省が開発したマイクロサテライトマーカーから、多型が存在すると期待できる504マーカーを検索し、そのマーカーについてモデル集団を用いて多型解析を行った。解析の結果から、allele数、ヘテロ接合率、サイズ範囲等を考慮して選定したマーカーを日本短角種特有の個体識別マーカーセットとした。マルチプレックスPCR法を用いてPCR供試本数を減らすことにより、個体識別をより低コストで省力的に実施する手法について検討した。

(ｳ) 枝肉および血統情報を含むデータベースの構築とその利用

枝肉および血統情報の取得のため、岩手県内の日本短角種飼養農家より同意書を得た。血統情報は、日本短角種登録協会および岩手県農畜産物価格安定基金協会、枝肉情報は日本食肉格付協会より提供を受けた。さらに、それらの情報をデータベース化すると共に、遺伝的な産肉能力の推定、近交係数の計算等を行い、日本短角種の改良、保留雌牛の選定、適切な交配等に活用した。

(ｴ) 個体識別技術を用いた流通牛肉の個体認証の実証

流通されている日本短角種牛肉について、牛肉と全頭採血により得られたサンプルを(ｲ)の手法で開発した個体識別マーカーセットを用いて同一性を検査した。

ウ　研究結果

(ｱ) 日本短角種全個体からのDNAサンプル採材

平成15年～平成17年にかけて、岩手県内の日本短角種より血液サンプルを採取した結果、合計で6857頭分となった。

(ｲ) マイクロサテライトマーカーを用いた日本短角種の個体識別技術の開発と簡易判定技術の確立

504マーカーを用いて、16頭のモデル集団における多型解析を行った結果、allele 数が 4 を最頻として 0 から10まで広く分布していた（図1307-1）。allele 数、ヘテロ接合率、サイズ範囲等を考慮し、12マーカーセット（1 グループ 6 マーカーで 2 グループ）を選定した（表1307-1）。このマーカーセットを井上らが開発した黒毛和種の個体識別マーカーセットと比較すると、さらに、セット 1 およびセット 2 に属する 6 マーカーそれぞれをマルチプレックス PCR（表1307-2の条件）に供したところ、マーカー型の判定が可能となる程度まで増幅された。また、PCR、電気泳動、マーカー型判定に要する必要時間を計算したところ、解析頭数が20頭であればマルチプレックスを使わない従来法と比較して大きな差がないものの、100頭規模の多頭数の解析においては、必要時間が半分程度にまで削減された（図1307-2）。

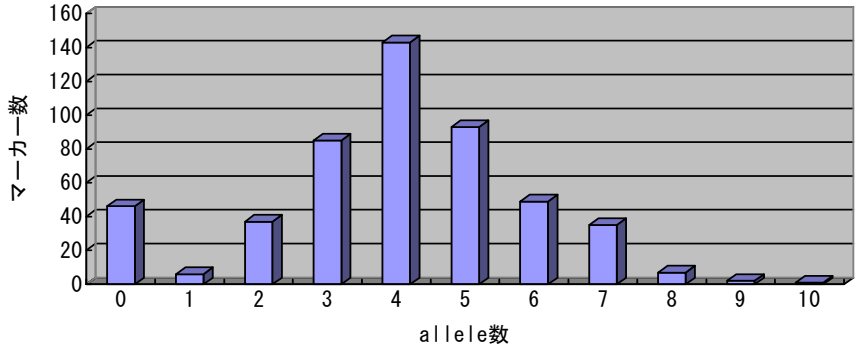


図1307-1　モデル集団における各マーカーの allele 数

表1307-1　構築した日本短角種の個体識別マーカーセット

set	name	Chr	label	Ann. Tmp.	allele	黒毛和種 サイズ範囲	日本短角種 サイズ範囲	ヘテロ 接合率	個体識別 頭数	父権 否定率	総合 排除率	種雄牛 判別頭数
1	BMS2270	24	F	58	6	70-98	82-94	0.7311	4	0.50	0.50	2
1	BMS1899	14	H	58	7		109-131	0.7311	14	0.50	0.75	4
1	BMS2742	10	T	58	7	131-149	133-153	0.8242	79	0.65	0.91	11
1	MB019	23	H	58	8	189-213	186-218	0.7656	336	0.56	0.96	26
1	BM1706	16	T	56	7		241-259	0.8111	1,777	0.63	0.99	69
1	BMC1222	13	F	58	7	241-291	274-290	0.7688	7,690	0.58	0.99	163
2	BMS1967	9	T	58	7	82-102	82-102	0.5177	15,948	0.31	1.00	236
2	BMS772	5	F	58	7	128-144	124-138	0.7622	67,069	0.54	1.00	510
2	BMS650	19	H	60	7	134-174	147-165	0.7644	284,729	0.55	1.00	1,124
2	MB067	26	F	58	6	183-192	184-206	0.6785	885,823	0.45	1.00	2,063
2	URB042	2	T	58	7	218-231	218-236	0.6887	2,846,251	0.43	1.00	3,622
2	CSSM026	22	H	58	7	242-256	238-271	0.7688	12,315,508	0.56	1.00	8,323

表1307-2　マルチプレックス PCR の条件

	従来法		マルチプレックス	
	温度(℃)	時間(分)	温度(℃)	時間(分)
初期活性化	94	4.0	94	15.0
活性化	94	0.5	94	0.5
アニーリング	55(60)	0.5	60	1.5
エクステンション	72	0.5	72	1.0
最終エクステンション	72	5.0	60	30.0
サイクル数	30		35	
総PCR時間	約2時間		約3時間	
templateDNA濃度(ng/μl)	0.6		0.6	
マーカー濃度(μM)	0.4		1.2(0.2×6)	

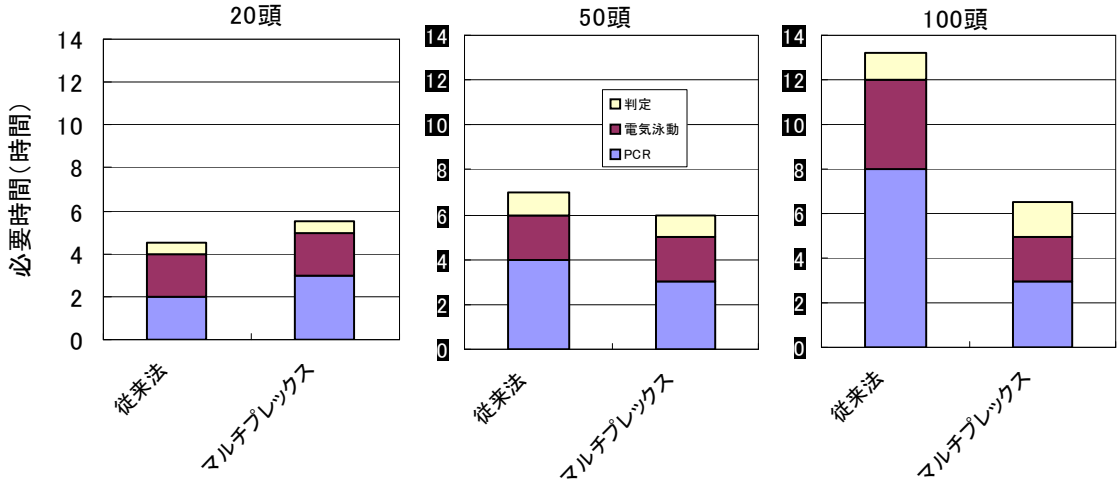


図1307-2　マルチプレックス PCR 使用時の解析に要する時間

表1307-3　得られた遺伝的パラメータ

	枝肉重量	ロース芯面積	バラ厚	皮下脂肪厚	歩留基準値	BMSno	きめ	しまり
枝肉重量	0.34	0.40	0.57	0.35	−0.18	0.01	0.08	0.09
ロース芯面積	0.35	0.37	0.26	−0.18	0.64	−0.04	−0.19	−0.11
バラ厚	0.56	0.37	0.25	0.41	0.00	0.20	0.32	0.33
皮下脂肪厚	0.43	0.00	0.37	0.50	−0.81	0.19	0.07	0.21
歩留基準値	−0.21	0.64	0.20	−0.67	0.43	−0.06	−0.09	−0.13
BMSno	0.06	0.06	0.15	0.05	0.05	0.17	0.80	0.77
きめ	0.12	−0.01	0.21	0.12	−0.04	0.32	0.20	0.92
しまり	0.10	−0.03	0.18	0.13	−0.06	0.44	0.40	0.18

右上；遺伝相関、左下；表型相関、対角；遺伝率

(ｳ) 枝肉および血統情報を含むデータベースの構築とその利用

収集した54,888頭の血統データと10,925頭分の枝肉データを収集し、産肉能力を計算した。得られた遺伝的パラメータは表1307-3の通り。また、血統図や遺伝的能力、近交係数等を表示できるソフトを作成し、各地域へ配布した。

(ｴ) 個体識別技術を用いた流通牛肉の個体認証の実証

今開発した個体識別マーカーを用いて、流通している牛肉 4 サンプルと放牧地で収集した血液サンプルとの同一性を調査したところ、どのサンプルについてもマーカー型が一致し、間違いなく流通されていることが明らかとなった。

エ　考　察

(ｱ) 日本短角種全個体からの DNA サンプル採材

岩手県内の日本短角種純粋種の血液サンプルを全て採取・保存したことにより、トレーサビリティーへの活用のほか、近交係数の上昇に伴って発生の恐れがある遺伝的不良形質等の原因解明、産肉能力に関する遺伝子解析等、育種学的な分野においても貴重なサンプルとなりうることが考えられた。

(ｲ) マイクロサテライトマーカーを用いた日本短角種の個体識別技術の開発と簡易判定技術の確立

今回は個体識別技術を構築したが、多型情報を詳細に検討すると、黒毛和種のサイズ範囲とことなるサイズの allele も存在した。これにより、今回は個体識別マーカーセットを構築したが、将来的には日本短角種品種判別技術開発等への応用の可能性も示唆

された。また、日本短角種の個体識別において、INOUE-MURAYAMA らが開発した黒毛和種の個体識別マーカーセットを用いた場合と比較すると、使用するマーカー数が少なく、PCR の増幅にも優れ、解析も容易であったことから、日本短角種の個体識別をより省力的に実施できることが明らかとなった。さらに、マルチプレックス PCR 法を用いた解析では、templateDNA 濃度が通常より高濃度であったが、アニーリング、エクステンション、最終エクステンションの時間や反復回数を従来法よりも増やした結果、使用する12マーカー全てでマーカー型が判別できる程度に増幅され、個体識別をより省力的に行うことが可能となった。通常、日本短角種は、放牧地における自然交配（まき牛）による繁殖形態が一般的であるが、種雄牛の故障等により、複数の種雄牛を交配させる場合がある。そういった状況下では、多頭数の親子判別を行う必要があるが、今回開発したマルチプレックス PCR は多頭数においてより省力化が可能な技術であるため、より効率的に判定ができるものと考えられた。

(ｳ) 枝肉および血統情報を含むデータベースの構築とその利用

日本短角種は、年々飼養頭数が減少し、それに伴って集団の近交係数が上昇傾向にある。そのため、急激な近交上昇を避け、集団を維持するためには、血統情報を整理し、適切な種雄牛を交配することが必要である。今回作成したデータベースを活用することで、産子の近交係数や産肉能力を容易に検索することが可能であり、集団の維持に大きな役割を果たしうると考えられた。

(ｴ) 個体識別技術を用いた流通牛肉の個体認証の実証

無作為抽出した流通牛肉を調査した結果、どのサンプルでも生前の血液DNAサンプルと一致しており、流通過程における他個体の肉との入れ替わりなどが無いことがわかった。今回のような判定技術を用いたトレーサビリティシステムが日本短角種において充分可能であり、消費者の安心を勝ち取る上での手法として活用できることが示唆された。

オ　今後の課題

(ｱ) 日本短角種全個体からの DNA サンプル採材

今後は、近交上昇による遺伝病の発生や経済形質の効率的な改良に備え、DNA サンプルを保管していくとともに、地域で容易に採取が可能となるよう、より簡易で低コストかつ精度の高い採材方法を考案する必要がある。特に、トレーサビリティー等に活用する場合、個体識別技術を主体とする判定を行うため、今後も採材を持続していく必要がある。

(ｲ) マイクロサテライトマーカーを用いた日本短角種の個体識別技術の開発と簡易判定技術の確立

今回の研究で、日本短角種の多型情報が多く収集できたため、今後これらを詳細に解析し、品種判定や集団の遺伝的多様性の確保等、より高度な解析技術の開発が課題である。

(ｳ) 枝肉および血統情報を含むデータベースの構築とその利用

現在は、血統や枝肉情報が主体であるデータベースであるが、今後は遺伝的不良形質等もデータベースに組み込み、経済性を低下させる要因を除去するなど、情報を充実させ、より高度なデータベースを作成する必要がある。

(ｴ) 個体識別技術を用いた流通牛肉の個体認証の実証

今後は、今回開発した種々の技術を駆使し、低コストな個体認証を現場レベルで実施し、日本短角種牛肉の高度な認証システムを確立する必要がある。

カ　要　約

(ｱ) 日本短角種全個体からの DNA サンプル採材

岩手県内の日本短角種6857頭から DNA サンプルを採取・保存した。

(ｲ) マイクロサテライトマーカーを用いた日本短角種の個体識別技術の開発と簡易判定技術の確立

日本短角種の個体識別に適したマイクロサテライトマーカーセットを構築するとともに、マルチプレックス PCR により省力的に個体識別を行う技術を開発した。

(ｳ) 枝肉および血統情報を含むデータベースの構築とその利用

遺伝的能力・近交係数等、育種学的に重要なデータを含むデータベースを構築し、種雄牛造成や保留雌牛の選定に活用した。

(ｴ) 個体識別技術を用いた流通牛肉の個体認証の実証

子牛時に採取した血液 DNA と牛肉の DNA を比較し、同一性を確認することで適正な流通が行われていることがわかった。

キ　引用文献

INOUE-MURAYAMA et. al., 1997. Anim. Sci. Technol. (Jpn.). 68(5):443-449

研究担当者（安田潤平*、佐藤洋一、鈴木暁之、小松繁樹、吉川恵郷）

8　ニワトリ品種特異的核ゲノムマーカーの開発

ア　研究目的

日本においては地鶏、特殊鶏が生産されており、流通段階及び食肉段階でのトレーサビリティー及び系統や品種の診断法が求められている。本研究では、AFLP 法を用いて、主要なニワトリ品種に特異的な核ゲノム領域を補足し、これをクローニングすることにより品種特異的なゲノム構造を塩基配列レベルで明らかにする。この情報を基に、国内外の主要品種に特異的な SNPs 等を PCR によって簡易に検出する方法を確立する。

イ　研究方法

鶏肉生産に用いられている代表的な品種のうち、ホワイトコーニッシュ、レッドコーニッシュ、ホワイトプリマスロック、ニューハンプシャー、ロードアイランドレッド、横斑プリマスロック、比内、土佐､および対馬種の核DNAについてAFLP解析を行った。

品種特異的に得られた DNA 断片についてクローニングし、塩基配列の決定を行い、あわせて相同性検索を行った。得られた塩基配列情報からプライマーを設計し、全ての個体について PCR を行ない、得られた SNP s を品種識別に用いることが出来るかを検討した。

ウ　研究結果

(ｱ) AFLP 解析に用いた64種類のプライマーセットにより、9 品種で158の品種間で差異があると思われる DNA 断片を得た（図1308-1)。

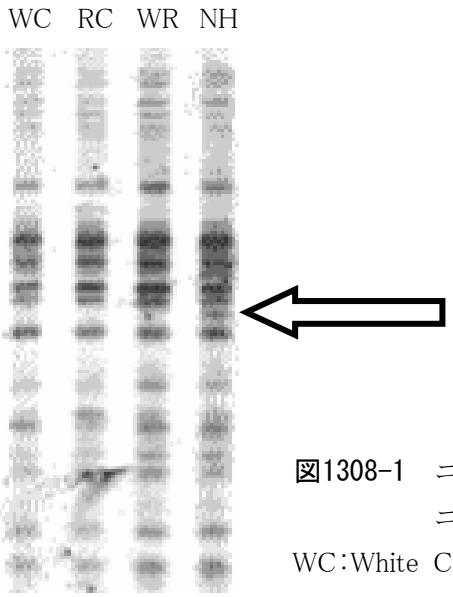


図1308-1　ニワトリゲノムの AFLP パターンと
ニューハンプシャー種特異的バンドの例
WC:White Cornish、RC:Red Cornish、WR:White Rock、NH:New Hampshire

(ｲ) 9 品種（各々20-42羽）の鶏の AFLP 解析の結果として、11の品種特異的 DNA 断片が得られ、これらの塩基配列の決定と相同性検索を行った。PCR により的確な増幅が可能か確認した結果、比内、土佐、およびニューハンプシャーの 3 品種において、実験に供したサンプルについては100％の確率で品種識別が可能な SNPs が得られた。ロードアイランドレッドについても、プライマーの組み合わせにより、識別が可能であることが示された（図1308-2～4)。また、他にも品種間で特異性を示すものが得られた。これらの識別可能な部位は、特定の遺伝子にある場合と、そうでない場合があった。

エ　考　察

比内鶏、土佐地鶏については、当該地鶏特異的な単塩基置換（SNPs）マーカーを見いだすことが出来たが、他の地鶏についても、日本在来であるなら、このようなマーカーを見いだすことが可能と考えられる。

オ　今後の課題

外国種のうち、交雑を経て造成された品種につい

ては品種特異的マーカーを見いだすことは困難と考えられるが、国産地鶏については必要に応じ、本解析法を用いて地鶏系統特異的DNAマーカーを見いだすことが出来る可能性が高い。

3015601 CAAAAGCCTA TCAGAGTAGA AATAATCTGT TCCTATAAAC TATAAAATAT CCTAATGCAA
3015661 TGCAAAATGT AATCATGTTC ATAGAATCAG AGAATGACCG GGCTTGGAAG AAACCTATAA
3015721 CAGTCATCTT GTCCTGGTCA AAAATCTAGA GCAGACTGCC TAGGACCACG TCCAAACAGC
3015781 TTTAGAAGAT CTTCAAGAGG GGGACTCCAC AACCTTTCTA GGCAACCTGC GCGGTGCTCA

比内はA→T

R	B	H	TO	TSU	WC	RC	WR	NH
(n=20)	(20)	(20)	(30)	(42)	(21)	(22)	(22)	(22)
0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

R:ロードアイランドレッド、B:黄斑プリマスロック、H:比内、TO:土佐、TSU:対馬 WC:ホワイトコーニッシュ、RC:レッドコーニッシュ、WR:ホワイトロック、NH:ニューハンプシャー

図 1308-2　Z 染色体上の比内特異的変異とPCRによる検出割合

1572961 CCATTTTCAA AGCGATCCAT CATTTCTGAT GGAACATTTT GGATTCAAGT CACCATCAAA
1573021 GTTTTGTCTG TAGACCTTAT TTCCTTATTC ATATCAGCAT CAACAAAAAA AGGTTAACAA
1573081 TGACAGGAAA AGCAAGAGAA TATATGCTTA GAAGGAAGCT GAAGTAAGCA GAGGGAGAAT
1573141 CAGGAGCCCA TGTAAAAGTA GAGGATTTTC TCAGTCATTC CAGAAACTCG TGTTCAGGTA

土佐はA→G

R	B	H	TO	TSU	WC	RC	WR	NH
0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%

図 1308-3　1 番染色体上の土佐特異的変異とPCRによる検出割合

19621 CAACGTGAAA GAGAGCAGAA GGCCTCAAAT ATGACAGGTT TCTAAAAAAA ATTACATGGA
19681 ACTCACTGGA TGGATAAAGC AAAGAGCTCC AGTTGCATAT CCTCACTGAA AGAGGTTGCA
19741 ACCTAACTCA GCTCTTTGAG TTTCTGGCTG GCTGGTTCAT GTGCCCTCGT TGGCTGAGTA
19801 TTAGGCATGA GTATCCTGAG CAGGCCAAAA CATATTTGTC TCTGAAGCAG CTGAGTTACT

ニューハンプシャーはC→G

ロードアイランドレッド、ニューハンプシャーおよび比内、土佐の一部はA→G

R	B	H	TO	TSU	WC	RC	WR	NH
0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%
100%	0%	10%	37%	0%	0%	0%	0%	100%

図 1308-4 Guanine nucleotide exchange factor p532 における変異とPCRによる検出割合

カ　要　約

鶏肉生産に用いられている代表的な品種のうち、ホワイトコーニッシュ、レッドコーニッシュ、ホワイトプリマスロック、ニューハンプシャー、ロードアイランドレッド、横斑プリマスロック、比内、土佐、および対馬種の核DNAについてAFLP解析を行った結果、比内、土佐、およびニューハンプシャーの3品種において、実験に供したサンプルについては100％の確率で品種識別が可能なSNPsが得られた。

キ　引用文献

Y. Kubo, T. Mitsuhashi. Simple PCR based method for discrimination of chicken breeds. Poultry Science (in writing).

研究担当者（三橋忠由*）

9　ニワトリミトコンドリア DNA の品種間・品種内での多型解析

ア　研究目的

染色体 DNA に比べ変異が起きやすいミトコンドリア DNA（mtDNA）、その中でも特に変異が蓄積されやすい、D ループ領域における塩基配列多型を探索し、ニワトリの品種内、品種間でどのような多型が存在するかを調べる。この DNA 多型が、ニワトリ畜産物のトレーサービリティーに利用可能であるかの評価と、簡便な多型検出法の開発を目的とする。

イ　研究方法

(ｱ) ニワトリ mtDNA の D ループにおける一塩基多型(SNP)の検索

卵用鶏として広く普及している、白色レグホーン(WL)、横斑プリマスロック(BPR)、ロードアイランドレッド(RIR)の各品種 2 羽ずつから血液を採取し、鋳型 DNA の調製を行った。次に、DDBJ/EMBL/GenBank 国際塩基配列データベース(DNA データベース)に登録されていた、ニワトリ mtDNA の塩基配列情報(登録番号:X52392)を参照し、ニワトリ mtDNA の D ループ領域全体の増幅と塩基配列決定用に、7種類のプライマーを作製した(Harumi et al. 2004)。D ループ領域増幅用プライマーを用い、上記 3 品種・6 羽のニワトリから調製した DNA を鋳型として、PCR を行った。得られた PCR 産物は、塩基配列決定用プライマーを用いた Dye-terminator 反応を行い、377DNA シークエンサー(Applied Biosystems)による塩基配列決定と相互比較を行った。

(ｲ) SNP タイピング用プライマーの開発

(ｱ)により見出された SNP を元に、6 カ所の SNP で、PCR プライマーの片方の3’末端を SNP の位置とし、その隣の塩基(N2塩基)を A/C/G/T のそれぞれに換えたプライマーを作製し、PCR 産物の有無により SNP タイピングが可能であるかを検証した。SNP タイピング用として、96種類の N2塩基変更プライマーを作製した。PCR タイピングは、鋳型 DNA 濃度を 0.8ng/μℓ、8ng/μℓ、20ng/μℓとし、PCR サイクルを30サイクルおよび40サイクルで評価した(Harumi et al. 2004)。

(ｳ) ニワトリ品種間・品種内における SNP タイピングの試み

WL、BPR、RIR、さらにコマーシャル品種であるデカルブ XL(D)を加えた 4 品種、540羽のニワトリより血液を採取し、鋳型 DNA 調製を行った。これらを鋳型 DNA とし、(ｲ)で最終的に SNP タイピング用として得られたプライマーを用いて、5 カ所の SNP で PCR タイピングを試みた。

ウ　研究結果

(ｱ) ニワトリ mtDNA の D ループにおける SNP の検索

3 品種・6 羽のニワトリから、mtDNA の D ループ領域をそれぞれ PCR 増幅し、塩基配列の決定を行った結果、図1309-1に示すような11カ所の SNP が見出された。この情報を DNA データベースに登録した(登録番号：AB091008)。そのうち、217C/T、225C/T、243C/T、256C/T、261C/T の 5 つの SNP は約40bp 内に近接して存在していた。

(ｲ) SNP タイピング用プライマーの開発

図1309-1に示した 6 カ所の SNP に対して、96種類のタイピングプライマーを試みた。その結果、図1309-2のように、目的の SNP タイプの鋳型 DNA からのみ、PCR 産物が得られるプライマーを得ることができた。最終的に、SNP 特異的な PCR 増幅が得られるプライマーが21種類見つかった(Harumi et al. 2004)。そのうちの 5 カ所の SNP では、それぞれの SNP 特異的なタイピング用プライマーが得られた。しかし、167C/T では、片方の SNP に対応したタイピングプライマーしか得られなかった。

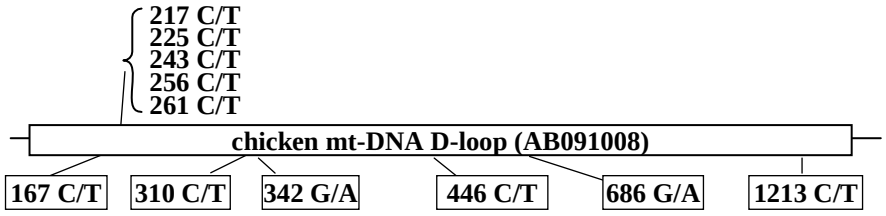


図1309-1　ニワトリ mtDNA の D ループ領域で見出された SNP
四角で囲んだ SNP は PCR タイピングを試みた SNP

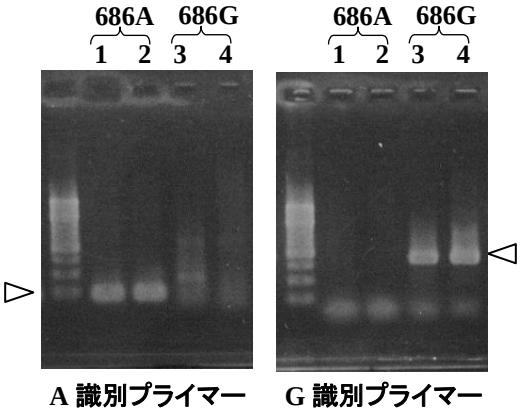


図1309-2
左図：686A 塩基判別用プライマーを用いた PCR
右図：686G 塩基判別用プライマーを用いた PCR
1-4：鋳型 DNA の個体番号
1・2：686番目の塩基が A 塩基である個体
3・4：686番目の塩基が G 塩基である個体
白ヌキ矢頭は目的の PCR 産物

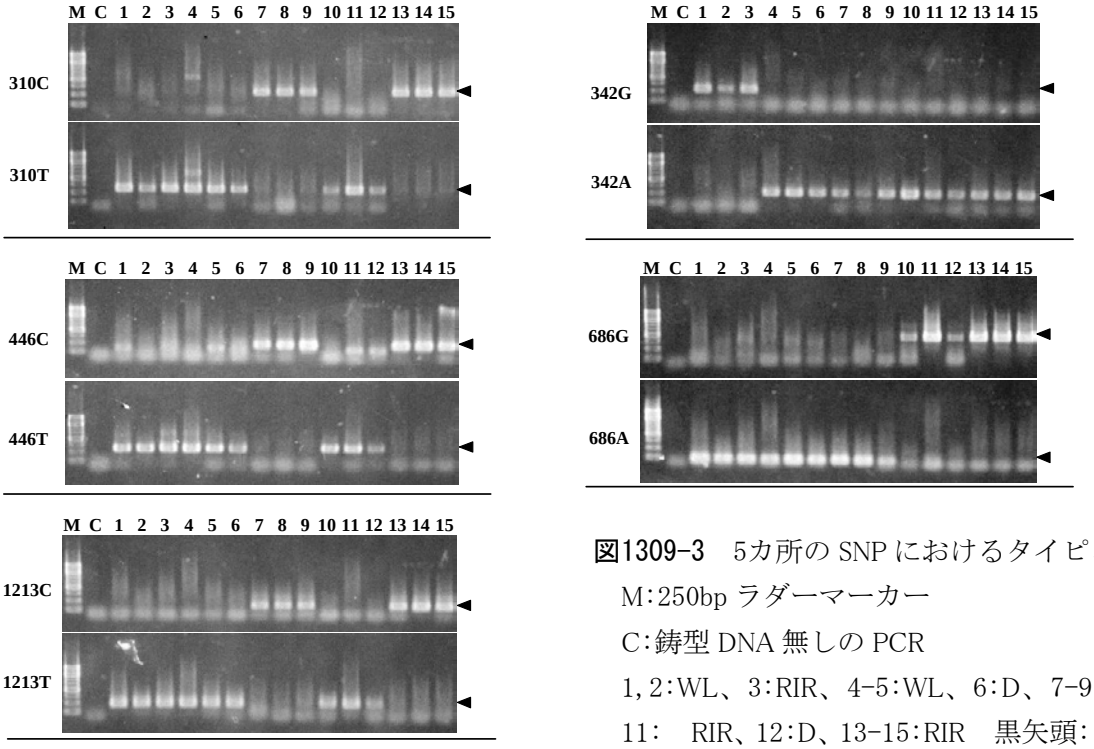


図1309-3　5カ所の SNP におけるタイピング例
M:250bp ラダーマーカー
C:鋳型 DNA 無しの PCR
1, 2:WL、3:RIR、4-5:WL、6:D、7-9:WL、10:BPR、
11:　RIR、12:D、13-15:RIR　黒矢頭:目的の PCR 産物

(ウ) ニワトリ品種間・品種内における SNP タイピングの試み

4 品種、540羽のメスニワトリから調製した鋳型 DNA を用いて、5 カ所の SNP をそれぞれタイピングした。その結果、図1309-3のように、5 カ所の SNP タイプの組合せにより、mtDNA を分類することができた。現在までに約500羽の SNP タイピングを行い、5 種類の SNP タイプに分けることができている。また、特定の SNP パターンのみが観察された品種や、同じ品種内でも系統の違いで SNP パターンが異なるなど、品種内で複数の SNP パターンを示すものもあった。これらの情報は未発表データであるため、詳細については今後、公表していく予定である。

エ　考　察

(ア) ニワトリ mtDNA のDループにおける SNP の検索

本研究で解析した卵用鶏 3 品種・ 6 個体間の、mtDNA･D ループ領域における塩基配列の比較では、SNP が数多く見つかる領域とそうでない領域があることが判った。その後、遺伝学的な起源を探るために、日本国内のシャモや在来品種ニワトリの品種・個体間で、D ループ領域の塩基配列決定が行われ(Komiyama et al. 2003, 2004)、各個体の塩基配列が DNA データベースに登録されている。その配列を相互比較すると、100カ所以上の SNP が見られる。今回の解析で得られた11カ所の SNP は､Komiyama ら(2003,

2004)の報告でも多くの個体で観察されるものであった。

(ｲ) SNP タイピング用プライマーの開発

6 カ所の SNP のうち 5 カ所の SNP では、2 つの SNP タイプのそれぞれに対応した、PCR タイピングができる N2変更プライマーが見つかった。片方の SNP タイプからしかタイピングプライマーが得られなかった167C/T では、この SNP 周辺の塩基に A や T 塩基が数多く含まれた為、PCR 自体がうまく行われなかった。これにより、167C/T の片方の SNP を識別できるプライマーが得られなかったと考える。得られた SNP タイピング用プライマーは、なるべく擬陽性の PCR 産物が観察されないものを選択した。最適な反応条件として8ng/μℓの鋳型 DNA、40サイクルの PCR 反応を選択したが、さらなる検討の余地があると考える。本研究により、ニワトリ mtDNA で SNP のタイピングを行うための、簡易で安価な解析手段を提供することができた。さらにこの解析手段は、ニワトリキメラ個体内で、由来品種の異なる細胞の識別などにも利用されている(Naito et al. 2004, Sano et al. 2005)。

(ｳ) ニワトリ品種間・品種内における SNP タイピングの試み

鳥類の mtDNA は、哺乳類同様にメスに由来する mtDNA のみが遺伝すると考えられている。地鶏の作製では、在来鶏のオスと卵用品種のメスの掛け合わせを用いる場合が多い。そこで本研究では、卵用鶏のメスの mtDNA が、どのような塩基配列の多様性／均一性を持つかを調べた。その結果、品種間だけでなく、品種内でも SNP タイプに違いが見出された。これは、品種が作製された過程での、メス系の由来を反映しているものと考えられる。5 カ所の SNP は 2 つの SNP タイプを示すため、原理的には2^5=32種類の SNP タイプが存在し得る。本研究では、そのうちの 5 種類の SNP タイプが得られている。また、Komiyama ら(2003, 2004)がデータベースに登録している配列情報から、mtDNA の D ループ領域全体は、20種類以上に分類できる。そして、本研究で PCR タイピングできた5カ所の SNP のタイプ分けに関しても、本研究で得られた 5 種類の SNP タイプに加え、さらに 4 種類の SNP タイプの存在が確認された。このような高い多様性から、ニワトリ mtDNA の SNP を用いて、畜産物のトレーサビリティーシステムを構築することは、可能であると考える。

オ　今後の課題

本研究で塩基配列決定・相互比較を行ったニワトリは、3 品種、6 羽と少なく、シャモや在来鶏で見られた、mtDNA の種類の多様性や多数の SNP が、卵用鶏などでも存在するかを知る必要がある。今後、多くの品種・個体で塩基配列決定／比較することが重要である。また、mtDNA をトレーサビリティーに利用する場合、SNP は世代を超えた安定性が必要とされる。mtDNA の塩基配列の多様性は、ニワトリの基礎集団が多様であった可能性と共に、mtDNA の変異性が高い可能性もある。mtDNA の SNP が次世代に遺伝する場合、どれ程の安定性を持つかの研究が必要と考える。本研究や Komiyama らの研究では、mtDNA の D ループ領域のみを解析・比較しているが、SNP が密集していると、SNP の PCR タイピングを行う際、不都合が起きる場合が想定される。さらに多種類の mtDNA を得るためにも、今後ニワトリ mtDNA 全体で、SNP の検索を行う必要があると考える。市販されている肉に関しては、おおもとのニワトリが海外の数社から供給され、増殖・供給されている状況であり、ホワイトコーニッシュやホワイトプリマスロックなどが利用されていると言われている。しかし、詳細な交配については企業秘密となっている。今後、市販の肉についても、SNP タイピングや塩基配列決定を行うことで、どれほどの多様性／均一性を持つものが、流通しているかを調べる必要がある。また、得られた SNP 情報を利用することで、実際のトレーサビリティーへの応用について検討を行う必要がある。これらの課題については、次期プロジェクトで継続して研究を進める予定である。

カ　要　約

3 品種、6 羽のニワトリにおいて、ミトコンドリア DNA・D ループ領域の塩基配列決定・比較を行い、11カ所の SNP を見出した(DNA データベース登録番号：AB091008)。そのうちの 5 カ所の SNP で、それぞれの SNP タイプを PCR 産物の有無で判定できる PCR プライマーを開発した。予備的解析として 4 品種、約500羽で 5 カ所の SNP をタイピングしたところ、5 種類の SNP タイプに分類できた。

キ　引用文献

Harumi T, Sano A Kagami H, Tagami T, Matsubara Y & Naito M. (2004) Polymerase chain reaction

detection of single nucleotide polymorphisms in the chicken mitochondrial D-loop region. *Animal Science Journal* 75, 503-507.

Komiyama T, Ikeo K, Tateno Y & Gojobori T. (2003) Where is the origin of the Japanese gamecocks? *Gene* 317, 195-202

Komiyama T, Ikeo K, Tateno Y & Gojobori T. (2004) The evolutionary origin of long-crowing chicken: its evolutionary relationship with fighting cocks disclosed by the mtDNA sequence analysis. *Gene* 333, 91-99.

Naito M, Sano A, Harumi T, Matsubara Y & Kuwana T. (2004) Migration of primordial germ cells isolated from embryonic blood into the gonads after transfer to stage X blastoderms and detection of germline chimaerism by PCR. *British Poultry Science* 45, 762-768.

Sano A, Harumi T, Hanzawa S, Kawashima T, Nakamichi H, Matsubara Y & Naito M. (2005) New screening test for male germline chimeric chickens by polymerase chain reaction using shingle nucleotide polymorphism detection primers. *The Jounal of Poultry Science* 42, 152-157.

研究担当者（春海　隆*）

10　国内特産鶏成立の遺伝的背景の解明

ア　研究目的

現在のブロイラーといえば、そのほぼ全てが白色コーニッシュ雄と白色プリマスロック雌の交配から得られた F_1個体であることは周知の事実である。この一般ブロイラーでは、産肉量を増やすことのみに重点が置かれ、肉の味に対しては注意が払われていないと言っても過言ではない。従って、必ずしも日本人の嗜好に合った鶏肉とは言いがたい。一方、日本人の嗜好に合致した鶏肉を生産する目的で、日本全国の各県において、日本在来のニワトリ品種と外国由来の商用品種を交雑することにより、特殊肉用鶏が生産され、それぞれに商標登録がなされている（日本食鳥協会，2003)。このような状況下では、鶏肉流通において、その偽装表示が起こる可能性が十分に考えられる。

本研究では、マイクロサテライトDNA多型を利用して、鶏肉生産に関与している、あるいは今後関与する可能性のある日本在来のニワトリ品種ならびに外国由来商用鶏品種に対し、それらの品種がもつ遺伝的変異性ならびに品種間の遺伝的類縁関係を明らかにすることを目的とした。また、鶏肉の偽装表示を看破するためのツールとして、品種特異的アリルを明らかにすること、ならびに複数のマイクロサテライトDNAマーカーのアリル頻度表を作成することを目的とした。

イ　研究方法

ニワトリ各品種の血液より抽出したDNAをテンプレートとして、PCR 法を行って、マイクロサテライト DNA を増幅した。自動 DNA シークエンサー(ABI 377)を用いて品種ごとに、マイクロサテライト DNA マーカー各座位におけるアリル型の判定を行った。この結果を元に、品種（集団）ごとに、1 座位当たりのアリル数(A)、多型を示す座位の割合(P_{poly})、ならびに平均ヘテロ接合率(H_e)を算出した。また各座位における各アリルの頻度を計算し、アリル頻度表を作成すると共に、品種特異的アリルを明らかにした。さらに、アリル頻度を元に算出した集団間の遺伝距離(D_A: Nei et al., 1983)に基づき、neighbor-joining 法(Saitou and Nei, 1987)を用いて、品種間の遺伝的類縁関係を明らかにした。A、P_{poly}および H_eの計算には CERVUS プログラム(Marshall et al., 1998)を、遺伝距離 D_Aの計算には DISPAN プログラム(Ota, 1993)を用いた。また、遺伝的類縁関係を示すデンドログラムの作成には TREEVIEW プログラム(Page, 1996)を用いた。

本研究では、日本鶏28品種（34集団）および外国由来商用鶏 7 品種（内種を含む）の合計41集団を用いた。品種名（内種を含む）は次の通りである。日本鶏：会津地鶏、矮鶏、愛媛地鶏、岐阜地鶏、比内鶏、地頭鶏、金八、声良、黒柏、小軍鶏、熊本、河内奴、蓑曳鶏、三重地鶏、宮地鶏、名古屋、尾曳、尾長鶏、大軍鶏、薩摩鶏、小国、土佐地鶏、土佐九斤、唐丸、東天紅、烏骨鶏、鶉尾、八木戸；外国由来商用鶏：横斑プリマスロック、ニュー・ハンプシャー・レッド、レッド・コーニッシュ、ロード・アイランド・レッド、白色コーニッシュ、白色レグホーン、白色プリマスロック。 1 品種当たり、原則的に24個体を用いた。また、マイクロサテライトDNAマーカーは20種（16の染色体に分布）を用いた（表1310-1)。

ウ　研究結果

日本鶏28品種(34集団)における、A、P_{poly}およびH_eの値は、それぞれ、1.75-5.10、0.55-1.00、および0.21-0.67であった（表1310-1)。外国由来商用鶏7品種（内種）は、いずれもこれらの範囲内の値を示した。総計41集団を比較した場合、23集団において、品種特異的アリルが発見された。また、品種特異的、非特異的にかかわらず、検出された全てのアリルに関し、集団ごとにその頻度一覧表を作成した（表1310-2)。

アリル頻度に基づき遺伝距離を算出し、次いで遺伝的類縁関係を示すデンドログラムを作成した結果、少数の例外はあるものの、日本鶏各品種と外国由来商用鶏品種は別グループに分類されることが明らかになった（図1310-1)。また、日本鶏の各品種は大きく4つのグループに分類された。この分類は、体型による分類と原則的に一致した。すなわち、日本鶏各品種は、i) コーチン（肉用鶏）タイプ、ii) マレー（闘鶏）タイプ、iii) 地鶏（卵用鶏）タイプ、ならびにiv)マレーと地鶏の中間的タイプの4つに大別された。

従来、小国と近縁であるとされていた黒柏および唐丸は、小国とは大きな遺伝的隔たりを示した。また、同様に、従来、大軍鶏あるいは薩摩鶏と近縁であるとされていた比内鶏もこれら2品種との間に大きな遺伝的隔たりを示した。尚、本研究結果におけるこれ以上の詳細は Osman et al. (2004, 2005, 2006ab)にまとめられているので参照願いたい。

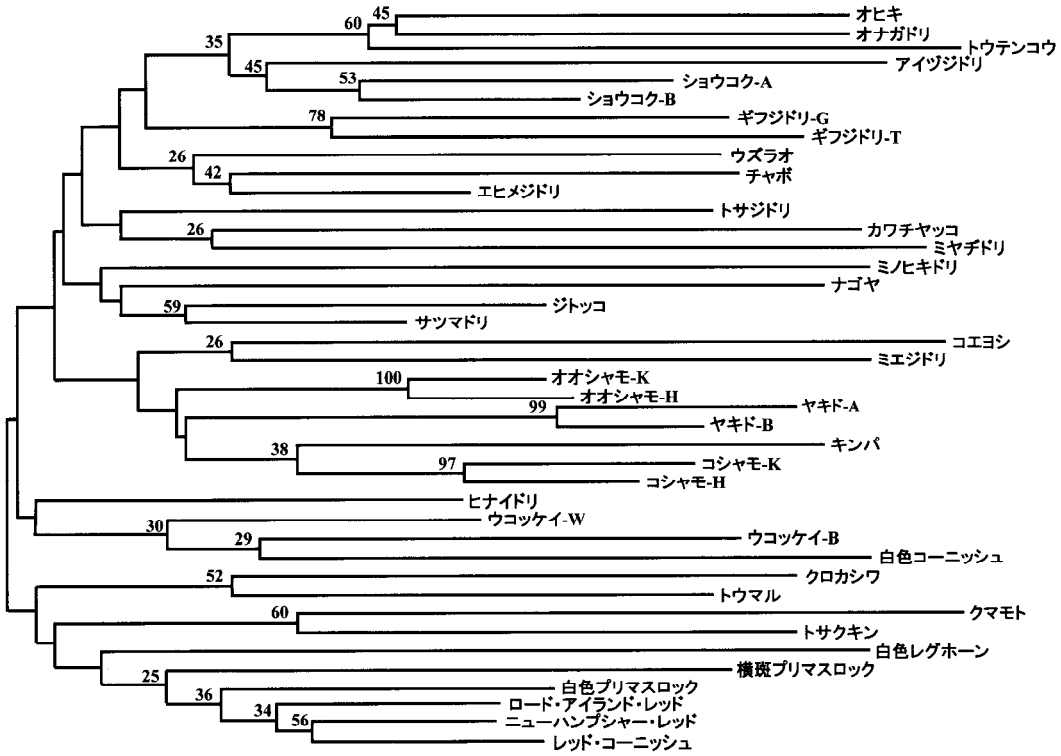


図1310-1　日本鶏ならびに外国由来商用鶏品種の遺伝的類縁関係

表1310-1　日本鶏ならびに外国由来商用鶏品種の遺伝的変異性（一部表示）

			品種/集団										
マーカー	染色体	全品種	会津地鶏	横斑プリマス	矮鶏	愛媛地鶏	岐阜地鶏-G	岐阜地鶏-T	比内鶏	地頭鶏	金八	声良	黒柏
ADL 262	23	3	3	2	3	3	3	3	2	3	1	1	1
LEI 092	6	16	4	4	3	6	4	3	4	8	3	2	3
LEI 096	2	10	2	3	3	5	4	3	5	4	2	1	2
LEI 099	12	9	3	3	3	4	3	2	3	3	3	1	1
LEI 135	28	9	3	5	3	5	3	3	4	6	1	2	2
LEI 209	1	18	7	3	4	6	4	4	3	2	4	2	1
MCW 067	10	7	3	3	2	5	2	2	3	3	3	1	2
MCW 145	1	9	3	5	5	4	2	3	4	5	2	1	3
MCW 183	7	13	3	3	2	3	2	2	2	3	1	3	3
MCW 193	5	12	2	3	4	7	3	4	6	6	2	2	2
MCW 214	5	17	2	3	3	6	4	3	3	5	4	1	2
MCW 217	18	8	5	4	2	5	5	3	2	4	2	3	2
MCW 222	3	6	2	2	5	3	3	4	3	4	2	2	3
MCW 233	27	7	2	3	2	4	3	3	4	2	2	2	3
MCW 240	4	14	2	3	3	10	5	4	4	5	3	1	1
MCW 252	3	14	3	2	4	6	4	2	4	6	4	2	2
MCW 295	4	9	3	2	4	6	4	2	5	4	2	3	2
MCW 301	24	18	2	3	6	8	3	2	3	8	3	3	3
MCW 322	13	6	3	3	2	3	3	1	2	2	2	1	2
MCW 330	17	12	1	3	2	3	4	1	3	4	1	1	2
A		10.85	2.90	3.10	3.25	5.10	3.40	2.70	3.45	4.35	2.35	1.75	2.10
P_{poly}			0.95	1.00	1.00	1.00	1.00	0.90	1.00	1.00	0.80	0.55	0.80
H_e			0.42	0.47	0.47	0.63	0.52	0.43	0.51	0.60	0.35	0.21	0.28

表1310-2　日本鶏ならびに外国由来商用鶏品種の各マイクロサテライトDNAマーカーにおけるアリル頻度（一部表示）

	アリル	品種/集団									
マーカー	サイズ (bp)	会津地鶏	横斑プリマス	矮鶏	愛媛地鶏	岐阜地鶏-G	岐阜地鶏-T	比内鶏	地頭鶏	金八	声良	黒柏
ADL 262	105	0.0208	0.8125	0.1087	0.1042	0.1579	0.3542	0.0000	0.1137	0.0000	0.0000	0.0000
	107	0.8542	0.0000	0.0217	0.1250	0.4737	0.1875	0.1875	0.2045	0.0000	0.0000	1.0000
	109	0.1250	0.1875	0.8696	0.7708	0.3684	0.4583	0.8125	0.6818	1.0000	1.0000	0.0000
LEI 096	216	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	224	0.0000	0.7500	0.1304	0.0625	0.5526	0.2708	0.0208	0.0227	0.0000	0.0000	0.4583
	230	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2105	0.4792	0.2500	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	234	0.9167	0.2292	0.7826	0.6042	0.0790	0.2500	0.2084	0.4091	0.5769	1.0000	0.0000
	236	0.0833	0.0000	0.0000	0.1041	0.1579	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	238	0.0000	0.0000	0.0870	0.0417	0.0000	0.0000	0.0000	0.3182	0.0000	0.0000	0.0000
	240	0.0000	0.0208	0.0000	0.1875	0.0000	0.0000	0.3333	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	242	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.4231	0.0000	0.0000
	244	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.5417
	246	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1875	0.2500	0.0000	0.0000	0.0000
LEI 099	113	0.0417	0.2292	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	115	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	117	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	119	0.2083	0.3750	0.0652	0.0417	0.5789	0.1667	0.6042	0.4772	0.5385	0.0000	0.0000
	121	0.7500	0.3958	0.6522	0.7083	0.3947	0.8333	0.3750	0.3864	0.3077	1.0000	1.0000
	123	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	125	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	129	0.0000	0.0000	0.2826	0.1042	0.0264	0.0000	0.0208	0.1364	0.1538	0.0000	0.0000
	135	0.0000	0.0000	0.0000	0.1458	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
LEI 135	130	0.0000	0.0000	0.3261	0.1042	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	132	0.4167	0.0000	0.4348	0.4583	0.0000	0.1042	0.0834	0.2045	1.0000	0.9808	0.2083
	134	0.5625	0.0833	0.2391	0.1250	0.0526	0.0208	0.4583	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	136	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1842	0.0000	0.0000	0.1591	0.0000	0.0000	0.0000
	138	0.0208	0.0208	0.0000	0.2708	0.0000	0.8750	0.2708	0.1364	0.0000	0.0000	0.7917
	140	0.0000	0.1250	0.0000	0.0000	0.7632	0.0000	0.1875	0.2273	0.0000	0.0000	0.0000
	142	0.0000	0.1042	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1818	0.0000	0.0192	0.0000
	144	0.0000	0.6667	0.0000	0.0417	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	152	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0909	0.0000	0.0000	0.0000

エ　考　察

日本鶏品種において観察された、A および H_e の値の範囲は、諸外国のニワトリ品種におけるそれらとほぼ同等の値であった（Ponsuksili et al.，1996；van Marle-Köster and Nel，2000；Emara et al.，2002；Hilell et al.，2003）。この事実から、日本鶏がもっている遺伝的変異性は、諸外国のニワトリ品種とほぼ同等のものであると考えられた。

35品種（41集団）を用いて、品種（集団）特異的アリルを調査した本研究において、特異的アリルをもつ集団は23であった。すなわち、全ての品種（集団）において特異的アリルが存在するわけではなかった。また、品種特異的アリルが存在するからといって、そのアリルの、品種内での頻度が必ずしも高いとは限らなかった。これらの事実から判断すると、一見、品種特異的アリルは偽装表示看破のためのDNAマーカーとは成り得ないようにみえる。品種特異的アリルを考える場合、比較する品種数が少なければ、特異的アリルの数は多くなり、比較する品種数が多くなれば、特異的アリルの数は減少する。目的の項で述べた、各県が作出している特殊肉用鶏は、その多くが2品種の交配により作出されている。また多くても、雑種作出に用いられる種品種の数は一般には4までである。このような少数の品種を比較する場合、品種特異的なアリル数は激増する。本研究では20種のマイクロサテライトDNAマーカーについて、そのアリル頻度一覧表を作成した。問題となる鶏肉がどうようなアリルの「組み合わせ」をもつかを調査し、この一覧表と比較対照することにより、特異的アリル頻度が高くない場合にも、品種識別は可能であると考えられる。

本研究は、その供試集団数、供試個体数ならびに使用マーカー数により、ニワトリにおけるこの種の研究においては、かつて類例をみない大規模研究であると考えられる。マイクロサテライトDNA多型に基づく遺伝的類縁関係分析により、日本鶏の各品種は大きく4つのグループに分類されたが、この分類は、原則的に、小穴(1951)による外部形態に基づく分類と一致した。ニワトリにおいて、DNA多型に基づく分類と外部形態に基づく分類がほぼ一致するという発見がなされたのは、本研究が最初であると考えられる。

オ　今後の課題

本研究では、部分的に、1品種につき2集団を調査したものもあるが、ほとんど全ての品種については、1品種1集団しか調査していない。実際には、日本鶏品種には複数の地域集団が存在するし、外国由来商用鶏には1品種（内種）内に複数の系統が存在する。今後、1品種（内種）に関し、より多くの地域集団あるいは系統について調査を行う必要があると考えられる。また、1品種当たりの供試個体数ならびに使用するマイクロサテライトDNAマーカー数も増加させることにより、より精密なアリル頻度表を作成することができ、品種識別の精度がさらに高まると考えられる。

カ　要　約

本研究は、マイクロサテライトDNAマーカーを20、ならびに1品種（集団）あたり原則24個体を用いて、日本鶏28品種（34集団）、外国由来商用鶏7品種の、総計35品種（41集団）における遺伝的変異性ならびに遺伝的類縁関係を明らかにしたものである。これは、ニワトリにおけるこの種の研究においては、かつて類例をみない大規模研究である。本研究により以下のことが明らかになった。

(1) 日本鶏各品種が示す遺伝的変異性は、外国で飼育されている品種のそれらとほぼ同程度であった。

(2) 日本鶏各品種と外国由来商用鶏各品種は遺伝的に異なるクラスターに分類された。また、日本鶏の各品種は大きく4つのグループに分類されたが、この分類は、体型による分類と原則的に一致した。

(3) 品種特異的アリルが存在することを確認するとともに、大規模アリル頻度表を作成した。この頻度表は、鶏肉の偽装表示看破（ニワトリの品種識別）のためのツールとして有効活用できると考えられる。

キ　引用文献

Emara, M. G., H. Kim, J. J. Zhu, R. R. Lapierre, N. Lakshmanan and H. S. Lillehoj. 2002. Genetic diversity at the major histocompatibility complex (B) and microsatellite loci in three commercial broiler pure lines. Poult. Sci. 81:1609-1617.

Hillel, J., M. A. Groenen, M. Tixier-Boichard, A. B. Korol, L. David, V. M. Kirzhner, T. Burke, A. Barre-Dirie, R. P. Crooijmans, K. Elo, M. W. Feldman, P. J. Freidlin, A. Maki-Tanila, M. Oortwijn, P. Thomson, A. Vignal, K. Wimmers and

S. Weigend. 2003. Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. Genet. Sel. Evol. 35:533-557.

Marshall, T. C., J. Slate, L. E. B. Kruuk, and J. M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Mol. Ecol. 7:639-655.

Nei, M., F. Tajima and Y. Tateno. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data: 2. Gene frequency data. J. Mol. Evol. 19:153-170.

日本食鳥協会. 2003. 国産銘柄鶏ガイドブック. 全国食鳥新聞社, 東京.

小穴 彪. 1951. 日本鶏の歴史. 日本鶏研究社, 東京.

Osman, S. A. M., M. Sekino, M. Nishibori, Y. Kawamoto, K. Kinoshita, Y. Yamamoto and M. Tsudzuki. 2004. Genetic variability and relationships of Japanese native chickens assessed by means of microsatellite profiling approach - Focusing on the Oh-Shamo (Japanese Large Game) and its related breeds. J. Poult. Sci. 41:94-109.

Osman, S. A. M., M. Sekino, M. Nishibori, Y. Yamamoto and M. Tsudzuki. 2005. Genetic variability and relationships of native Japanese chickens assessed by microsatellite DNA profiling-Focusing on the breeds established in Kochi Prefecture, Japan. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 18:755-761.

Osman, S. A. M., M. Sekino, T. Kuwayama, K. Kinoshita, M. Nishibori, Y. Yamamoto and M. Tsudzuki. 2006a. Genetic variability and relationships of native Japanese chickens based on microsatellite DNA polymorphisms -Focusing on the Natural Monuments of Japan. J. Poult. Sci. 43:12-22.

Osman, S. A. M., M. Sekino, A. Nishihata, Y. Kobayashi, W. Takenaka, K. Kinoshita, T. Kuwayama, M. Nishibori, Y. Yamamoto and M. Tsudzuki, 2006b. The genetic variability and relationships of Japanese and foreign chickens assessed by microsatellite DNA profiling. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 19: in press.

Ota, T. 2001. DISPAN: Genetic distance and phylogenetic analysis (last modified May 19, 2001) http://www.bio.psu.edu/people/faculty/nei/lab/programs.html.

Page, R. D. M. 2001. TREEVIEW (last modified Sept 3, 2001) http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod.

Ponsuksili, S., K. Wimmers and P. Horst. 1996. Genetic variability in chickens using polymorphic microsatellite markers. Thai J. Agr. Sci. 29:571-580.

Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4:406-425.

van Marle-Köster, E. and L. H. Nel. 2000. Genetic characterization of native southern African chicken populations: Evaluation and selection of polymorphic microsatellite markers. South Afrc. J. Anim. Sci. 30:1-6.

研究担当者（都築　政起*）

11　市場鶏肉の識別技術の開発

ア　研究目的

市中に出回っている鶏肉のほとんどは肉専用種（ブロイラー）によって生産されている。一方、日本農林規格（特定 JAS）において「地鶏肉」は「在来種由来血液百分率が50％以上のもの」と定義され、ほとんどの「地鶏肉」は、特定 JAS の許容範囲内において外国鶏種との交雑によって生産されている。このことが、地鶏鶏肉の DNA 識別を困難にしている。そこで本研究は、「ブロイラー鶏肉」と外国鶏種との交雑によって生産される地鶏肉を含む「地鶏肉」の DNA 識別手法の開発を目的とした。本研究では、地域特産鶏の二大ブランドである「名古屋コーチン」および「比内地鶏」を用いて、地鶏肉の DNA 識別手法の開発に取り組んだ。

イ　研究方法

(ｱ) 材料

ａ　名古屋コーチン

名古屋コーチンは明治初期に愛知県在来の地鶏と中国から輸入された「バフコーチン」を交配して作出され、明治38年に日本最初の実用鶏として公認された愛知県を代表する鶏品種である。愛知県が雛を供給する名古屋コーチンは、愛知県農業総合試験場が系統を造成し、愛知県畜産総合センター種鶏場が系統維持している名古屋コーチン４系統（NG1，NG2，NG3，NG4）の系統間交配によって作出される。そこで、愛

知県畜産総合センター種鶏場で飼育している名古屋コーチンの４系統382個体（NG1系統：82個体、NG2系統：100個体、NG3系統：100個体、NG4系統：100個体）を用いた。

b　比内鶏

比内鶏は昭和17年に天然記念物に指定された秋田県を代表する地鶏である。秋田県畜産試験場（以下、秋田畜試）では、昭和48年に秋田三鶏保存会から比内鶏の種卵を導入して以来、外部からの異血導入を行わず、種鶏を維持してきた。秋田畜試に由来するコマーシャル鶏「比内地鶏」は、秋田畜試で維持している比内鶏と、同じく秋田畜試で閉鎖育種したロードアイランド種（通称、秋田ロード）の一代雑種（F1）であって、ほとんどは雌である。そこで、「比内地鶏」生産の基礎である秋田畜試の比内鶏160個体、秋田三鶏保存会会員が所有する比内鶏195個体、合計355個体の比内鶏を用いた。

(ｲ) ゲノム DNA の抽出

DNA 抽出キット（Sepagene、三光純薬）を用いて、ゲノム DNA を抽出した。

(ｳ) マイクロサテライトマーカー

名古屋コーチンでは、25個のマイクロサテライトマーカーを用いた（表1311-1）。比内鶏では、名古屋コーチンで用いた25個に、表1311-2に示す90個を加え、合計115個のマイクロサテライトマーカーを用いた。

(ｴ) PCR の反応液組成および温度条件

PCR の反応液組成は、384ウェルプレートの１ウェルあたり6 µl とし、フォワードおよびリバースプライマー各2.5 pmol、 各100 µM の dNTP、1.2 mM の MgSO4、0.0125ユニットの KOD plus ポリメラーゼ（KOD-201、東洋紡）、 東洋紡から供給される1×の反応バッファー、30 ng のゲノム DNA を含むように調製した。フォワードプライマーは、DNA シーケンサーで検出できる波長を示す蛍光色素（FAM、HEX、NED）のいずれか１つで標識した。PCR 反応装置として、384ウェルヘッドを有する iCycler Thermal Cycler（バイオラッド)を使用した。PCR の温度条件を、図1311-1に示した。

(ｵ) マイクロサテライトマーカーのタイピング

PCR 産物をホルムアミドで約1,000倍に希釈して、サイズスタンダード（GENESCAN 400HD[ROX]、アプライドバイオシステムズ）と共に、DNA シーケンサー（モデル3100、アプライドバイオシステムズ）を用いて電気泳動した。マイクロサテライトマーカーのタイピング専用のソフトウェア（GeneMapper、アプライドバイオシステムズ）を用いて、PCR 増幅産物のサイズを基に、各個体・各マーカーの遺伝子型を判定した。

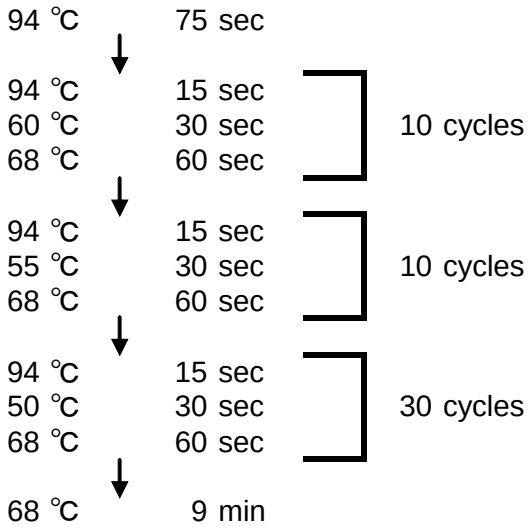


図1311-1　PCR の温度条件

表1311-1　マイクロサテライトマーカーのリスト①

Marker	PCR Primer Forward (5' -> 3')	Reverse (5' -> 3')	Chromosome	References	DDBJ Accession Number
ABR0015	AGTGCTGGCTGCATGGGTTA	CCGCCGCTTCCATTACAAAC	chr27	Takahashi et al. (2005)	AB186525
ABR0028	GTGCGAGGGCTTCGGATGTG	TGTGCTTGGGCTGCCGTTGG	chr6	Takahashi et al. (2005)	AB186528
ABR0046	GTGGTCCCGCCGTTTGCTCT	GCCGTGGGGAAACCGAAAGCA	chr5	Groenen et al. (2000)	AB186534
ABR0075	CATGAAGACCACAGCAAAGGG	CAGAACTGCAACAAATTCCAGAG	chr4	Takahashi (unpublished)	
ABR0223	TTTCTCCCAGTCTTAGCAGT	ATTTCACAGGCTTGACATCC	chr20	Takahashi et al. (2005)	AB186576
ABR0228	TCTGACAATCGGAGAAAGAACTCG	CCCTCCTTTGTTATCCCTCGT	chr8	Takahashi et al. (2005)	AB186578
ABR0257	AGACAGCAGTAGCCACCCAT	GCTCTGTTCTGAGGAGGAAG	chr17	Takahashi et al. (2005)	AB186589
ABR0258	GCATGACAGAAATGCCAATA	GATCAGAACTTAACCTCCCT	chr1	Takahashi (unpublished)	
ABR0297	ATGTTCCTTCATTTCCAGAG	GGTATCCATAGCAAGTTAGT	chr3	Takahashi (unpublished)	
ABR0343	AGGACAATTTCTCAAAGGTT	TTTCAAAGCAATATGAACAC	chr11	Takahashi et al. (2005)	AB186616
ABR0378	GACTTACTCACTAAGAGTGGAGAT	CTGTCATCATTGCTCTTGTG	chr28	Takahashi et al. (2005)	AB186633
ABR0417	AAGACAGACACCATGCCACC	TTTGAAGCCTGACAGAACCC	chrZ	Takahashi et al. (2005)	AB186650
ABR0419	TTAAACTGGAGAATATTTAACAGC	TGCTTATTTCCATTCACCAA	chr7	Takahashi et al. (2005)	AB186651
ABR0495	TTGTACTGGGTAGCATTTGA	ACTCTTTGGCCTACTTTTCC	chr10	Takahashi et al. (2005)	AB186663
ABR0506	ATCTTTATGGCTCCATCATA	TAACCATCAGGGATTACTGT	chr13	Takahashi et al. (2005)	AB186667
ABR0526	TCAATTCAGTACGTCCCACA	GCAGGAGCTGCCTATTACAT	chr9	Takahashi et al. (2005)	AB186678
ABR0617	CCAAGAACTCACATCAACGAGCAA	TGGAAGACTGGCAGGGAAGC	chr26	Takahashi et al. (2005)	AB186715
ABR0624	GAGCCTGAGGACAGAGTTCCA	CCATAGAGGTCGGCATTGTTT	chr21	Takahashi et al. (2005)	AB186719
ABR0634	TACTGAATAAAAGGAGGAAC	AATAGCCAAATAGGTACAGC	chr12	Takahashi et al. (2005)	AB186723
ABR0645	TATTGTCCTTCCAATTACAT	CACGCACTTACATACTTAGA	chr2	Takahashi (unpublished)	
MCW0080	GAAATGGTACAGTGCAGTTGG	CCGTGCATTCTTAATTGACAG	chr15	Crooijmans et al. (1996)	L40045
MCW0217	GATCTTTCTGGAACAGATTTC	CTGCACTTGGTTCAGGTTCTG	chr18	Crooijmans et al. (1997)	G31912
MCW0304	TCAGTATGAGAGCTTCTCAAG	TTGTTACAAGGTCTTCTGGAG	chr19	Crooijmans et al. (1997)	G32060
ADL0262	GTGCAGACACAGAGGGAAAG	TCACATGCACACAGAGATGC	chr23	Cheng et al. (1995)	G01682
LEI0066	GATCAGATGCATCCAAAGTTC	GAAGCAGGAAAATAGAAAAGGC	chr14	Crooijmans et al. (1997)	X82813

表1311-2　マイクロサテライトマーカーのリスト②

Marker	PCR Primer Forward (5' –> 3')	Reverse (5' –> 3')	Chromosome	References	DDBJ Accession Number
ABR0006	GGGAGGAAGAAGACAAAGTAGCT	GTGGCACAGTGAGGTTAGGATGC	chr26	Groenen et al. (2000)	AB186521
ABR0013	TGCACTGCACTCCTATGGG	CCAACACCGAGCGTGAAGGC	chrUn	Takahashi et al. (2005)	AB186524
ABR0041	CCCTTTCCCATACCACCTCT	CTGTTGAACCTGTCATTAGCG	chr7	Takahashi et al. (2005)	AB186531
ABR0045	CACGTTTGGGTGATCTTCACT	CTTTCTACATACATCCTTTCTTG	chr4	Takahashi et al. (2005)	AB186533
ABR0076	TTGGAGGGTGCATCGAAAAT	AGACTCTGTAGCAGCATGTGGG	chr27	Takahashi et al. (2005)	AB186543
ABR0080	TTGCCCTGGGGCAGAACACG	CAACAGCTTTCGACGAGACGG	chrZ	Takahashi et al. (2005)	AB186545
ABR0082	TCCTGAATTTCCAAATAAGTTTTA	TAATCACAGCCCAAATCAAAG	chrZ	Takahashi et al. (2005)	AB186546
ABR0089	ATAATCACAGCCCAAATCAA	CCTGAATTTCCAAATAAGTTTTA	chrZ	Takahashi et al. (2005)	AB186548
ABR0109	ATGGTAACACCCAAACCCTG	GGGGAAACTGAGGCACATAC	chr26	Takahashi et al. (2005)	AB186550
ABR0112	TACTTTTATCCTGCTTCTCA	GCTTGTAGGGTAATCCAATG	chrZ	Takahashi (unpublished)	
ABR0113	CGACATCGTGCTGATACCTT	GTCCTCCTTCTGCTTTGCTG	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186551
ABR0117	CCTGGGATATGCTGAGATTAC	GCTAGTAGAACTTTTCTTTGG	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186553
ABR0119	ATTGGCATAAACCTGTGAAG	TTACTGAAACGGAGTGGAAG	chrZ	Takahashi et al. (2005)	AB186554
ABR0139	AAAAGCCTTGAGCTTCCACT	ACTTGTCTCAGCCTGCCTAC	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186558
ABR0161	AGCACCTGAGACTGAGAAGA	CTCGCAAAGTATGGAACTGA	chr3	Takahashi et al. (2005)	AB186563
ABR0169	CTGGACAAAGTCCCCATTTA	CCAGAGCCATAGGTCTAACTG	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186564
ABR0185	GTCTGGCTGAGTAATGCTGG	CTTGGCTAGATTAAGGTGAA	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186567
ABR0189	TTAACATTAAGAGCGCATCT	ATTTGAACTTCCAAAACACT	chr2	Takahashi et al. (2005)	AB186569
ABR0195	AACGAAATGCCAAGGGTTTA	CTGCCAATTTATTTGCTGTTGA	chr7	Takahashi et al. (2005)	AB186571
ABR0225	GAATGTAGCACCGAGGAATA	AGACAGGCACTTGTACTGGA	chr3	Takahashi et al. (2005)	AB186577
ABR0232	AAAAGACTATGGCAGAACAGA	ATACAGTGGGTGGCAACAAGC	chr3	Takahashi et al. (2005)	AB186579
ABR0241	ATACACTCGGCAAGCCAGAC	CCCGGATCAGCTCATAAAGAC	chrZ	Takahashi (unpublished)	
ABR0242	TGGAATAAAGGGTGAATGTG	GTTTGCTGTTCGGTTGGTTG	chr14	Takahashi (unpublished)	
ABR0245	GATTTCTTTCTATGGCTGTTG	TTTCTTCACTTTGCACCTTC	chr3	Takahashi et al. (2005)	AB186583
ABR0247	CAAGTGGTTTGGTTATTGCT	ATTACTGCTGCTTTGTTTGC	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186584
ABR0254	TTTGGTAACTGAGTAAATAGC	ACTTTGTAGGAAATGGACTT	chrZ	Takahashi et al. (2005)	AB186587
ABR0274	AAGAGTCAACAGAGCACCAG	TCGTAGTTTAGAACCCAATA	chr7	Takahashi et al. (2005)	AB186593
ABR0277	AACCAAGCCAGAGGATAAAT	CAAAGCAGAAACAAGATGAT	chr5	Takahashi et al. (2005)	AB186594
ABR0280	CAGAGGTGCTGACAGAGTGA	CTGGCTGTAATTTCAGGTGT	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186595
ABR0284	TGTTAAACTAGCCATTTTGT	TATTTGAGGAAGCAGACAGC	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186597
ABR0287	CCAGATTTCCATTAGTGCTC	CAAATGTACTCTTTCACAGTCG	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186598
ABR0289	TTCTCAAACTGTTAAGGTCCAC	AACTCCCACTCCACCACAAC	chrZ	Takahashi et al. (2005)	AB186599
ABR0311	CCTAAAGCAGGAAGGCAGAA	TTGGAGCATTTGTGGAGAAG	chrZ	Takahashi et al. (2005)	AB186606
ABR0315	TAAACCAAACCACCACTGAA	GGCACTTACCTTCCTCCTTC	chr4	Takahashi et al. (2005)	AB186607
ABR0318	ACCAGTTTGCCCTTAACATT	TATTCCCACGGTCTGATACA	chr3	Takahashi et al. (2005)	AB186608
ABR0325	CATTCTGTTTTCATTTCTGAT	ACGTGCTGCACTAATTTTAC	chr10	Takahashi et al. (2005)	AB186609
ABR0326	TCTGCCCCTTTCTCCCTTCC	TTCCTTTCTTATGGTCTGTGC	chr7	Takahashi (unpublished)	
ABR0353	GCCCTCATACAATGTTCAGT	TTACCTCCTTTGTAAATCTG	chr3	Takahashi et al. (2005)	AB186620
ABR0364	GAGGCTCTGAGGATGACTGAC	ATGTAATGGGTTGGCATGTTT	chr20	Takahashi et al. (2005)	AB186626
ABR0376	AGGGTATGGATGTCTTACTA	CACAAAGTTCCTGAATAATA	chrZ	Takahashi (unpublished)	
ABR0377	TTGTATCATGCAAAATCTGGT	GGCAGTCTGATCTAGTGGGT	chr9	Takahashi et al. (2005)	AB186632
ABR0389	AAAGTGCCAGACTCAACAAG	TTCCCTCTATCAGCATCCATCC	chr11	Takahashi et al. (2005)	AB186639
ABR0424	CTTCAGCCTCAAGCACTCAG	ACCTAACAAAATCGGACAAA	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186653
ABR0472	AACACGCACCATTTATCTTA	CCCTGACTGCTACATTATTG	chr3	Takahashi et al. (2005)	AB186659
ABR0493	CTCCTCCACTCACTCTGTTG	TTGGAAAGATTGTATGAAACC	chr2	Takahashi et al. (2005)	AB186662
ABR0500	CATCCCATAGGTTATTCCAT	CCAGAAATATCAGTAGTGCC	chr2	Takahashi et al. (2005)	AB186664
ABR0505	TTATTTATGGCACTCCACTG	TATTCCTTGTTTTGCTTTGA	chrZ	Takahashi (unpublished)	
ABR0524	TCCTACCGAAGGCAACAGAA	GGCCCACTTAGCAGATGGAGAAT	chrZ	Takahashi et al. (2005)	AB186676
ABR0530	GGCTGTCCGTGCTGCTATTC	TGACACCCGCTGTGGTCAAT	chr17	Takahashi et al. (2005)	AB186680
ABR0532	ACAAAGCCAACACCATTTAA	ACAACTATCTGGAGGCAGTA	chr2	Takahashi et al. (2005)	AB186682
ABR0542	GTGCCACCTTTCCATTTCTG	CTCCCTCTGCATCATTTCTTTG	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186686
ABR0544	CACTAAGAATGGGGCCAGAG	GGTGCAGAGTTCACCTATTTCA	chr4	Takahashi et al. (2005)	AB186688
ABR0569	GCAGAAGGGATAAGATAGAC	AAACAACACCACCACAAGAT	chr2	Takahashi et al. (2005)	AB186696
ABR0579	TAATGCTAAAACTGCTCCTT	AGCTGTATGCTTCTTGATGT	chr2	Takahashi et al. (2005)	AB186699
ABR0584	GCAGTCAATCACGGTAAGTT	TGTTAGGATTTGGTGGTTTC	chr2	Takahashi et al. (2005)	AB186702
ABR0588	ATACAATCCAGCATCTCACA	CCCATTATTCGTTATTCTTACTT	chrZ	Takahashi et al. (2005)	AB186705
ABR0594	CTGGACCACAGCAGTTATTC	CAATACCTCAGGGAACAGAA	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186707
ABR0598	CAGGTCCTTTGCTACTTACA	GTACTCCGCAGACTTTCACT	chrZ	Takahashi et al. (2005)	AB186709
ABR0604	ATTAACAAATCTACACGTTTTCC	CACTAACAACTCGTTTATGGG	chr8	Takahashi et al. (2005)	AB186711
ABR0605	AGGGCAGTCTTTACTGAGGC	GTGAAATTCAAGCTGGCACA	chr6	Takahashi et al. (2005)	AB186712
ABR0608	GCAGGAAGGTTCACAGAAAG	TTGGCAATAGCTTCAAAACA	chrZ	Takahashi et al. (2005)	AB186713
ABR0609	TACGGAGTATGAAAGATTTG	CTTTATTCCCAAGAACAGAT	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186714
ABR0620	GCCAGCTTCAGGGAACAAAA	TGAAACGCAAAATCAACGGA	chrZ	Takahashi et al. (2005)	AB186716
ABR0621	ACTTTCCCTCTTGCTGGACT	GTTGGCATGACTTTGTTGCT	chrZ	Takahashi et al. (2005)	AB186717
ABR0632	CAGGGCTGTTGTTGTTTATCT	CCAAGGTTTCTTTGCCATTA	chr20	Takahashi (unpublished)	
ABR0633	AGTATGTTATTGCCTGTGGC	TTTGGGAGAAGGAATGTTGT	chrZ	Takahashi et al. (2005)	AB186722
ABR0636	TCAGCGAGTCTTGCAGATGT	GTGAAGGATTAAAGGGTAAA	chr7	Takahashi et al. (2005)	AB186724
ABR0649	CCTCAGTGGCAAAGTGAATA	TTAGTGGGAAATACTGGTGG	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186728
ABR0651	TGGGAAAAGTCAGTAGAACA	TGCATTATTACATCCCATCT	chrZ	Takahashi et al. (2005)	AB186730
ABR0657	CAGCAACAAACAAATACAAA	AGTAAGGTATCATCAGAGGG	chrZ	Takahashi et al. (2005)	AB186732
ABR0664	CTGGAATACAGTGAGGAGAC	TGAAGTGACGGTAAGTAAGA	chr3	Takahashi (unpublished)	
ADL0106	CATTCTCTGATTCTGCCTTT	AACTCCTGGTGTGCTACAAA	chr10	Cheng et al. (1995)	G01550
ADL0123	GTTCATTTGGAGTTTGAGATT	GGTTGCTAGAGTGTTTAGAGG	chr11	Cheng et al. (1995)	G01557
ADL0250	AAGCCGTACTGAGAAGCACT	CAGGCACAGTAGAAAAGAAC	chrZ	Hu et al. (2001)	G01670
ADL0258	TCATTTCAGCTCACATTTTA	TTTTCAGGTTGTCTGGTTGC	chr8	Cheng et al. (1995)	G01678
ADL0279	CATGGCTGTTGCTTTACATA	GTGAACCCCAATGCTCTCTG	chr7	Hu et al. (2001)	G01699
ADL0306	GTTACTGTATCTTGGCTCAT	TCAGTTTGACTTTCCTTCAT	chr3	Hu et al. (2001)	G01721
HUJ0002	GAATCCTGGATGTCAAAGCC	ATCTCACAGAGCCAGCAGTG	chr17	Crooijmans et al. (1997)	L10228
LEI0094	GATCTCACCAGTATGAGCTGC	TCTCACACTGTAACACAGTGC	chr4	Gibbs et al. (1997)	X83246
LEI0121	TTGACGTCCTGGATAGATTAC	ATTATCCAGAACTAACATCAAC	chrZ	Crooijmans et al. (1997)	X85536
LEI0135	CACAATGAAGGATGAATAGTGC	AATTCACAGTCACACCTGAGG	chr28	Crooijmans et al. (1997)	X82864
LEI0145	CTGTTCATCTTCCTCTCAGTC	GATCTTGAATATAGACCTTGG	chr5	Crooijmans et al. (1997)	X83252
LEI0146	TCAAGCCACCAAAGTGCTTGG	GATCACTCTGCTCATAGCAGT	chr1	Wardle et al. (1999)	X83254
LEI0158	ATTGTTATCTCCAGAGAGGAC	GTCCTTGATGAATTGGTTAGC	chr7	Crooijmans et al. (1997)	X85520
MCW0067	GCACTACTGTGTGCTGCAGTTT	GAGATGTAGTGCCACATTCCGAC	chr10	Crooijmans et al. (1997)	G31945
MCW0103	AACTGCGTTGAGAGTGAATGC	TTTCCTAACTGGATGCTTCTG	chr3	Crooijmans et al. (1997)	G31956
MCW0118	ATGATGAAGCATTTAGTCTAAG	CAATTTACTCAGAGATGCAGTG	chr6	Crooijmans et al. (1996)	L43642
MCW0185	GATCTACTGTCATTTTAGTTT	TGAATAGATTTCAGTGAGTGC	chr2	Crooijmans et al. (1997)	G31976
MCW0298	AACACTGACACGAATAAGGCC	GATCCAGCCTGTCCAAATCC	chr2	Crooijmans et al. (1997)	G32055
MCW0327	GTCCTTGCCATGTATTGACTG	CAGCACTAAGTGGCTGACATC	chr1	Crooijmans et al. (1997)	G32082

ウ　研究結果

(ｱ) 名古屋コーチン

名古屋コーチンでは、4つの常染色体マーカー（*ABR15, ABR257, ABR495, ADL262*）、1つのZ染色体マーカー（*ABR417*）、合計5マーカーにおいて、それぞれ一つの対立遺伝子に固定していること、すなわち名古屋コーチンは決まった対立遺伝子のホモ型を示すことがわかった（表1311-3）。

表1311-3　名古屋コーチンで固定した対立遺伝子を持つマーカーと検出される対立遺伝子

Marker	Size of Alleles (base pairs)
ABR0495	230
ABR0257	327
ADL0262	106
ABR0015	262
ABR0417	122

そこで5マーカーにおいて、名古屋コーチンには存在しない対立遺伝子が一つでも検出されたら、「名古屋コーチンではない」と否定できるのではないかと考え、サンプリング調査を行った。その結果、調査した448サンプル（他の純粋種、ブロイラーおよび名古屋コーチン交雑種）全てにおいて、名古屋コーチンではないと判定できた（表1311-4）。

表1311-4　純粋品種、コマーシャル・ブロイラーおよび名古屋コーチンの交雑種における、名古屋コーチンタイプの遺伝子型の出現頻度と識別率

Sample		locus						Judgement		
		ABR495	*ABR257*	*ADL262*	*ABR15*	*ABR417*		Nagoya	Not Nagoya	Actual P_E
	n [b]	230/230 observed	327/327 observed	106/106 observed	262/262 observed	122/122 or 122/w observed	P_E	*n* [a]	*n*	1 - a / b
Purebreds	130									
White Leghorn	17	0.250	0.071	0.083	0.286	0	100%	0	17	100%
Rhode Island Red	17	0	0.313	0.545	1.000	0	100%	0	17	100%
White Plymouth Rock A	20	0	0.737	0	0.263	0	100%	0	20	100%
White Plymouth Rock B	9	0	0.556	0	0.556	0	100%	0	9	100%
Red Cornish	11	0	0.400	0.286	0.545	0	100%	0	11	100%
Barred Plymouth Rock	29	0.059	0.345	0	0.034	1.000	100%	0	29	100%
New Hampshire	27	0	1.000	0.714	0.926	0.259	100%	0	27	100%
Broiler chicken	95	0.340	0.084	0.053	0.789	0.495	99.94%	0	95	100%
Crossbreds between Nagoya and a purebred	223									
White Leghorn ♂ × Nagoya ♀	30	0.846	0	0.103	1.000	0	100%	0	30	100%
Rhode Island Red ♂ × Nagoya ♀	30	0	0.750	0.759	1.000	0	100%	0	30	100%
White Plymouth Rock A ♂ × Nagoya ♀	30	0.385	1.000	0.481	0.357	0	100%	0	30	100%
White Plymouth Rock B ♂ × Nagoya ♀	28	0.588	1.000	0	0.625	0	100%	0	28	100%
Red Cornish ♂ × Nagoya ♀	29	0.167	0.071	0	1.000	0	100%	0	29	100%
Nagoya ♂ × White Leghorn ♀	27	0.471	0.240	0	0.615	0.556	100%	0	27	100%
Nagoya ♂ × Rhode Island Red ♀	26	0	0.462	0.680	1.000	0.615	100%	0	26	100%
Nagoya ♂ × White Plymouth Rock A ♀	23	0	1.000	0.250	0.619	0.522	100%	0	23	100%

以上の結果から、名古屋コーチンでホモ型を示す5つのマイクロサテライトマーカーを調査することにより、名古屋コーチンと他の鶏を識別できることが明らかになった。

(ｲ) 比内鶏

比内鶏では、5つの常染色体マーカー（*ABR13*、*ABR277*、*ABR500*、*MCW298*、*MCW327*）、5つのZ染色体マーカー（*ABR89*、*ABR241*、*ABR311*、*ABR633*、*ADL250*）において、それぞれ一つの対立遺伝子に固定していることが分かった。すなわち、秋田畜試の比内鶏とのF1個体では、比内鶏で固定している10個のマーカーの対立遺伝子がセットで検出されなければならないことが分かった。

エ　考　察

(ｱ) 地鶏肉のDNA識別の現状

日本農林規格において「地鶏」は、「在来種由来血液百分率が50%以上のもの」と定義され、ほとんどの地鶏生産では、日本農林規格の許容範囲内において外国鶏種との交雑が行われている。また、日本農林規格は「在来種」を「明治時代までに国内で成立し、又は導入され定着した、別表に掲げる鶏の品種」

と定義し、別表品種には横斑プリマスロック、ロードアイランドレッドといった外国鶏種を含んでいる。これらの事柄が示しているように、「地鶏」のほとんどは、外国鶏種との交雑によって生産されていることから、地鶏肉と他の鶏肉を識別することは大変難しい。

本研究は、名古屋コーチンのように同一品種内の系統間交配によってコマーシャル鶏が生産されている場合には、比較的容易に鶏肉識別ができることを実証した。この成果は、特許申請すると共に、論文にまとめ Poultry Science に投稿し、受理されている。

一方、比内地鶏のように、特定の地鶏品種と外国鶏の一代交雑によってコマーシャル鶏が生産されている場合には、名古屋コーチンのように容易ではない。本研究では、比内鶏で固定している10マーカーを調べることによる比内地鶏の DNA 識別の可能性が示されたが、比内地鶏の DNA 識別手法の確立には至らなかった。

(ｲ) 交雑によって作出されるコマーシャル地鶏肉の識別に向けて　－比内地鶏をモデルとして－

比内地鶏のような交雑によって作出されるコマーシャル地鶏肉の DNA 識別手法の確立に向けては、常染色体と Z 染色体マーカーの多型性の違いに注目できる。比内鶏で固定した遺伝子型を示したマーカーは、常染色体マーカーでは94個中 5 個、Z 染色体マーカーでは21個中 5 個であった。すなわち、Z 染色体の方が常染色体よりも、「地鶏」に特徴的なマーカーを見つけやすいことが示された。

また、比内地鶏の生産形態にも注目できる。比内地鶏は、比内鶏の雄とロードアイランド種の雌の一代雑種であって、コマーシャル鶏のほとんどは雌である。したがって、比内地鶏の雌の性染色体（ZW）の Z 染色体は、間違いなく比内鶏の Z 染色体である。

したがって、今後、Z 染色体マーカーの調査に重点を置いて、比内地鶏の DNA 識別手法の確立に向けた研究を推進する必要がある。

オ　今後の課題

(ｱ) 名古屋コーチンの DNA 識別手法

本課題終了後、名古屋コーチンの DNA 識別手法の簡易キットを開発した。また、簡易キット販売に名乗りを上げる民間企業があり、愛知県および生物研と特許の実施許諾に向けて協議しているところである。

(ｲ) 比内地鶏の DNA 識別手法

目的と出口が明確で、実績を伴った本課題が 1 年間で中断されたことは遺憾であるが、幸い、平成18年度畜産草地研究所戦略的研究推進費（シーズ培養研究）のサポートを受け、比内地鶏の DNA 識別手法の開発に成功した（未発表）。名古屋コーチンに倣い、特許申請、論文公表に向けた作業を進めているところである。

(ｳ) 共同研究

名古屋コーチン、比内地鶏での実績を基に、他の地鶏生産県・企業から共同研究の申し出があれば、他の地鶏肉の DNA 識別手法の開発研究に積極的に取り組む所存である。

カ　要　約

(ｱ) 目的

本研究はマイクロサテライトマーカーを用いて、地域特産鶏の二大ブランドである「名古屋コーチン」および「比内地鶏」の DNA 識別手法の開発を目的とした。

(ｲ) 名古屋コーチン

本研究では、名古屋コーチンに特徴的なマイクロサテライトマーカー 5 個を見出し、同マーカーを調査することによって、名古屋コーチンと他の鶏を識別できることが実証され、名古屋コーチンの DNA 識別手法が開発された。

(ｲ) 比内地鶏

比内地鶏の雄親である比内鶏に特徴的なマイクロサテライトマーカー10個を見出し、同マーカーを調査することによる比内地鶏の DNA 識別の可能性が示された。

キ　引用文献

Cheng et al., 1995. Poultry Science. 74:1855-1874.
Crooijmans et al. 1996. Poultry Science. 75:746-754.
Crooijmans et al. 1997. Animal Genetics. 28:427-437.
Gibbs et al., 1997. Animal Genetics. 28:401-417.
Groenen et al. 2000. Genome Research. 10:137-147.
Hu et al., 2001. Nucleic Acids Research. 29:l06-110.
Okumura et al. 2000. Animal Science Journal. 71:J222-J234.
Sasazaki et al. 2004. Meat Science. 67:275-280.
Takahashi et al. 2005. Animal Genetics. 36:463-467.
Wardle et al., 1999. Animal Genetics. 30:238-241.

研究担当者（高橋秀彰*）

第４章　食品の生産・流通履歴の迅速検証技術の開発

１　非破壊分析による魚介類の凍結履歴の判別技術の開発

ア　研究目的

平成11年の JAS 法改正に伴い、凍結解凍した生鮮水産物は平成12年７月から「解凍」の表示が義務づけられた（水産物品質表示基準 2000，生鮮食品品質表示基準 2000）。表示の適正化を図り、消費者・流通業者・生産者の利益を保護するために、解凍魚であるかどうかの判別手法の確立は急務となっている。しかし、これまでに提唱された方法は一定量以上の血液採取が必要であるなど一般的な販売形態の切り身加工には適用できなかったり、鮮度の低下した未凍結魚では凍結履歴の有無が判別困難である等、凍結履歴の有無を現場で正確かつ簡便に判別できる実用的な方法はなく、このことが「解凍」に関する表示の検証を行う上での障害となっている。本研究では，我が国の主要魚介類のうち、「凍結履歴のない生鮮魚介類」と「解凍魚介類」の両方が流通する数種について，凍結履歴の有無を容易に判別できる実用的技術を開発することを目的とした。

イ　研究方法

(ｱ) 各種指標による凍結履歴判別精度の検討

各種の凍結履歴判別指標の妥当性を確認するため、マアジ（*Trachurus japonicus*）、サンマ（*Cololabis saira*）、カンパチ（*Seriola dumerili*）、マダイ（*Pagrus major*）、ヒラメ（*Paralichthys olivaceus*）、マサバ（*Scomber japonicus*）を対象として、各種凍結条件下での血液塗抹標本及び筋肉スタンプ標本による血球破壊率（吉岡・北御門 1988）、ヘマトクリット値（Yoshioka 1983）、眼球水晶体の白濁（Love 1956，Yoshioka and Kitamikado 1983）、トリーメーターによる誘電率（Jason and Richards 1975）の変化ならびに氷温貯蔵中の経時変化を検討した。凍結貯蔵は−10℃、−20℃、−40℃、−80℃冷蔵庫中、あるいは液体窒素浸漬により凍結し、1−7日間凍結後、流水中で解凍を行い、各種分析用試料魚とした。

a　血液塗抹標本および筋肉スタンプ標本の作製

血液塗布標本は試料魚の動脈球または心室から血液を採取し，直ちにスライドグラスに塗沫した。筋肉スタンプ標本は試料魚背部から約1cm 角の試料片を切り出し、スライドグラスに軽く押し当て、筋肉中の微量の血液をスライドグラスに付着させた（山下 2002）。これらの標本は乾燥・固定後、ギムザ染色し、顕微鏡観察を行った。

b　血球破壊率の測定

血球細胞の顕微鏡観察像を写真撮影し、画面上の全血球数ならびに核のみが観察される血球数をカウントし、次式により血球破壊率を算出した。

血球破壊率（%）＝$T/T_0 \times 100$（T：全血球数、T_0：核のみが観察される血球の数）

c　ヘマトクリット値

試料魚の動脈球、心室よりヘマトクリット（Ht）値測定用ガラス毛細管に採血し、遠心分離後、次式により Ht 値を算出した。

Ht（%）＝$L/L_0 \times 100$（L：遠心分離後の赤血球体積、L_0：遠心分離前の赤血球体積）

d　眼球水晶体の観察

眼球から水晶体（中心部）を摘出し、グリセリンで湿らせた状態で透明か白濁しているかを肉眼で観察した。

f　トリーメーター値の測定

トリーメーター（TMR）値の測定は、TMR（英国 Distill 社製）のプローブ（先端）を試料魚の体表面に密着させて測定した。

(ｲ) 魚肉ドリップを用いた近赤外分析による凍結履歴の判別

魚肉から滲出するドリップを濾紙上に採取し、その成分を近赤外分析法で測定する方法について検討した。試料魚として活マアジ80尾を即殺後、40尾は生鮮試料として、残り40尾は−40℃で48時間凍結処理後解凍して用いた（凍結解凍試料）。生鮮試料については、細砕した魚肉を遠心分離して得られた上清をドリップとした。凍結解凍試料の場合は、解凍時に発生するドリップを用いた。得られたドリップをグラスファイバーフィルターに滴下し、フィルター全体に浸潤させた後、30℃で約30分間乾燥させた。乾燥させたフィルターをスタンダードサンプルカップに固定し、近赤外分析装置 NIRS6500（NIRECO 製）による分析に供した。得られた反射スペクトル（1100〜2500nm）は、Vision Software ならびに The Unscrambler Software により解析し、判別分析を行った。

(ｳ) ファイバープローブを用いた近赤外分析による凍結履歴の判別

簡便な非破壊的方法の検討のため、試料魚の体表面に直接光ファイバープローブを接触させて近赤外分析を行う方法について検討した。試料魚介類として、マアジ、マダイ、クルマエビ、ホタテガイを用い、即殺直後の生鮮試料および凍結解凍試料（-40℃で凍結し10日間保存後解凍）それぞれ50尾を用いた。近赤外分析装置に装着したファイバープローブを魚体に接触させて近赤外分析を行った。得られた拡散反射スペクトル（700-1100nm）は The Unscrambler Software により解析し、判別分析を行った。

(ｴ) 近赤外分析による凍結履歴の判別精度に及ぼす各種要因の影響の検討

凍結履歴判別精度に及ぼす凍結前の鮮度および凍結温度の影響を検討した。大船渡産のサンマ200尾を用い、漁獲当日から10日間氷蔵し、経時的にサンプリングして鮮度の異なる生鮮魚ならびに凍結解凍魚を調製した。凍結解凍魚については各種温度帯（-20、-30、-40、-80℃）で保管後、解凍して近赤外分析に供した。近赤外分析および統計解析は(ｳ)と同様の方法により行った。

ウ・エ　研究結果と考察

(ｱ) 各種指標による凍結履歴判別精度の検討

従来より提唱されている判別指標のなかでは血球観察法の信頼性が高く、直接血液を採取できない切り身でもスタンプ標本により血球観察が可能であった。また凍結魚では殆どの赤血球細胞質の破壊がみられ凍結履歴の判別に有用であった（写真1401-1）。ただし、未凍結であっても冷蔵中に同様の血球破壊がみられるため、K 値等の他指標の併用が必要であることが数種類の魚介類について明らかとなった。

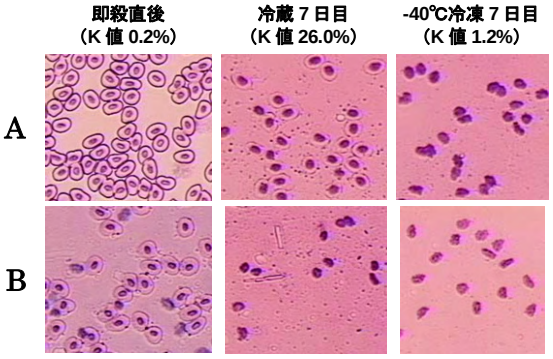


写真1401-1　血球観察による凍結履判別の例
A:血液塗抹標本　　B:筋肉スタンプ標本

(ｲ) 魚肉ドリップを用いた近赤外分析による凍結履歴の判別（Uddin and Okazaki 2004）

魚肉から滲出するドリップの量および成分は凍結履歴の有無により異なっており、凍結魚からは解凍時にドリップを容易に得ることができた。これらドリップを滴下したグラスファイバーフィルターを乾燥させ、近赤外分析に供した。フィルターを乾燥させたのは、水分による影響を排除し、ドリップに含まれる成分そのものの比較を容易にするためである。近赤外分析の結果、生鮮魚および凍結解凍魚ではそのスペクトルパターンにわずかな違いが観察され、とくにタンパク質の構造に由来する波長である1510、1700、1738、2056、2176、2298、2350nm に差異が認められた。そこで判別分析を行ったところ、両者が明確に判別できた（図1401-1）。

(ｳ) ファイバープローブを用いた近赤外分析による凍結履歴の判別（Uddin *et al.* 2005）

生鮮魚介類の体表面に光ファイバープローブを直接的に接触させて近赤外分析（700-1100nm）を行う方法について検討したところ、凍結によりスペクトルが下方にシフトする傾向がみられた。得られた生スペクトルおよびこれらを MSC（乗算的散乱補正）処理したものを、PCA（主成分分析）評点に基づく SIMCA 解析法および LDA（線型判別分析）により判別分析を行ったところ、マダイ・マアジでは凍結履歴の有無が明瞭に判別できた（図1401-2）。MSC 処理により判別精度が低減されたことから、凍結履歴の有無による近赤外スペクトルの差異は、化学的要因よりも物理的要因の寄与が大きいことが推察された。

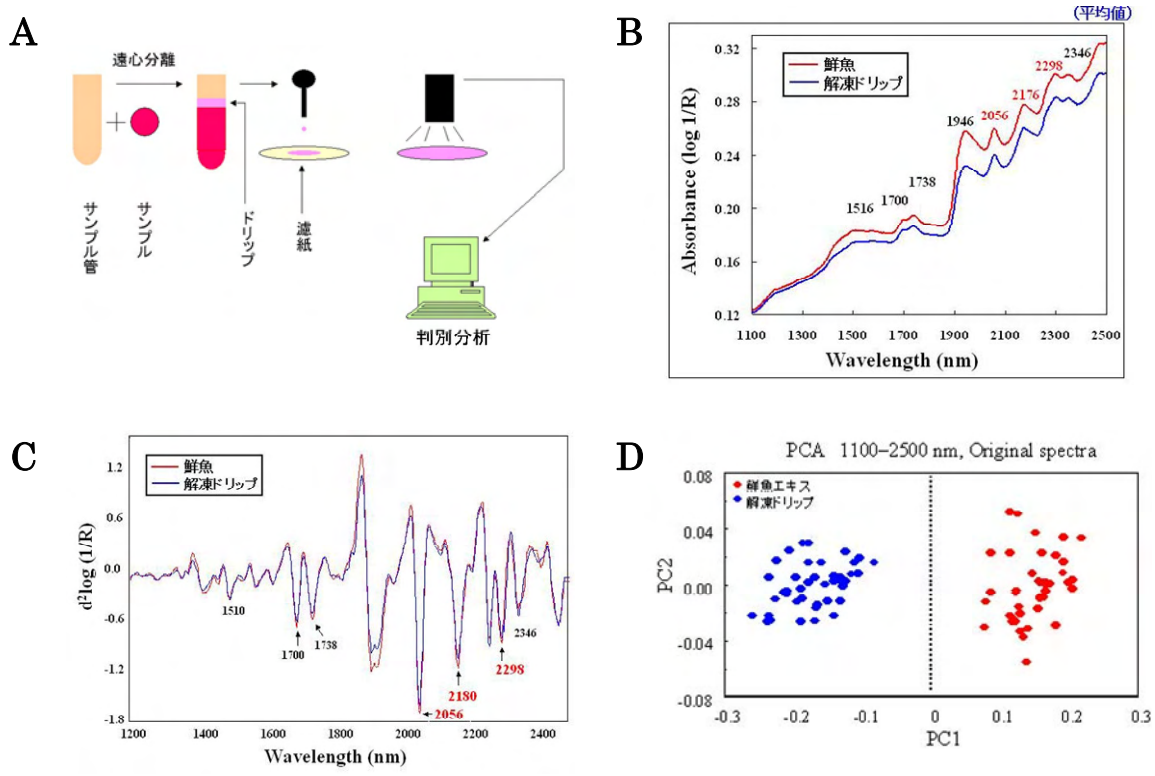


図1401-1　マアジ鮮魚・解凍魚のドリップによる近赤外分析スペクトルの判別分析
A:魚肉ドリップ近赤外分析の模式図　　B:原スペクトル
C:二次微分スペクトル　　D:主成分分析

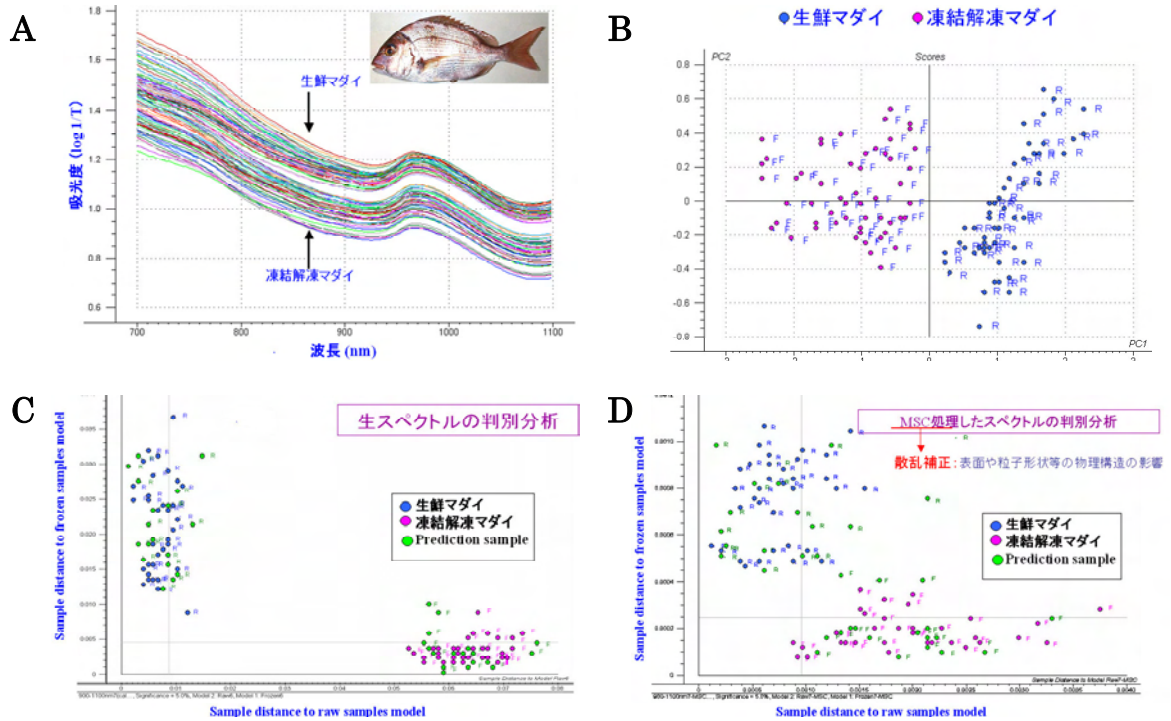


図1401-2　近赤外スペクトル PCA スコアを用いた SIMCA 分析結果に及ぼす MSC 処理の影響
A:原スペクトル　　B:主成分分析
C:SIMCA 分析　　D:MSC 処理したスペクトルの SIMCA 分析

(ｴ) 近赤外分析による凍結履歴の判別精度に及ぼす各種要因の影響の検討

凍結履歴判別の信頼性を高めるため、鮮度や凍結条件の異なる生鮮・凍結解凍サンマを用いて近赤外分析を行った。その結果、凍結温度（-20、-30、-40、-80℃）が異なっていても、生鮮魚と凍結解凍魚の判

別精度に大きな差は認められなかった。一方、漁獲当日～10日目の生鮮魚と、それらの各種鮮度で凍結した凍結解凍魚を用いて両者の近赤外スペクトルを比較した場合、鮮度が良好な場合ほど両者の判別精度が高く、鮮度が低下するにつれて判別精度が低下したが、一般に流通する鮮度であれば、凍結履歴の有無が概ね判別できることが示された（データは示していない)。

オ　今後の課題

近赤外分光法により凍結履歴の判別が可能であることが示されたため、これを一般の市販品に適用するためのより詳細な検討が必要である。このため、未凍結魚にあっては鮮度や保存条件、凍結魚にあっては凍結条件・解凍条件が近赤外分光スペクトルに及ぼす影響をさらに詳細に明らかにするとともに、魚種ごとの検証を行う。他の判別技術と組み合わせた実用的な判別フローを完成させ、食品表示の裏付けとなる検証技術として活用する。また、品質情報を付与した高度なトレーサビリティへの可能性を検討する。

カ　要　約

(ｱ) 眼球白濁、血液採取によるヘマトクリット値・血球観察は切り身やフィレーなどには適用できないが、凍結解凍魚判別の有用な指標であることが確認された。

(ｲ) 近赤外分析では、魚肉から滲出するドリップ成分を利用した方法、および魚体にファイバープローブを接触させる方法のいずれも、凍結履歴の有無を判別できることが示された。

(ｳ) 近赤外スペクトルによる凍結履歴の判別精度に及ぼす凍結前の魚肉鮮度、および魚体の凍結温度の影響を検討した結果、魚体ごとに変動はあるものの、一般に流通する鮮魚の鮮度であれば、凍結履歴の有無が概ね判別できることが示された。

キ　引用文献

Jason, A. C., and J. C. S. Richards 1975. The development of an electronic fish freshness meter. Journal of Physics E: Scientific Instruments. 8: 826-830.

Love, R. M. 1956. Post-mortem changes in the lenses of fish eyes. II. Effect of freezing, and their usefulness in determining the past history of the fish. J. Sci. Food. Agric. 7: 220-226.

Uddin, M., and E. Okazaki 2004. Classification of fresh and frozen-thawed fish by near-infrared spectroscopy. J. Food Sci. 69(8): C665-668.

Uddin, M., E. Okazaki, S. Turza, Y. Yamashita, M. Tanaka, and Y. Fukuda 2005. Non-destructive visible/NIR spectroscopy for differentiation of fresh and frozen-thawed fish. Food Chem. 70(8): C506-510.

Yoshioka, K. 1983. Differentiation of freeze–thawed fish from fresh fish by the determination of hematocrit value. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 49(1): 149.

Yoshioka, K., and M. Kitamikado 1983. Differentiation of freeze–thawed fish from fresh fish by the examination of medulla of crystalline lens. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 49(1): 151.

水産物品質表示基準 2000. 平成12年 3 月31日農林水産省告示516号.

生鮮食品品質表示基準 2000. 平成12年 3 月31日農林水産省告示第514号.

山下由美子 2002. 生鮮魚と凍結解凍魚の判別. 日本水産学会関東支部例会公開シンポジウム「水産物の品質表示に関する現状と課題」講演要旨集. 17.

吉岡慶子・北御門学 1988. 赤血球検査による凍結解凍魚フィレーと鮮魚フィレーとの鑑別. 日水誌. 54(7):1221-1225.

研究担当者（岡﨑惠美子*、山下由美子、大村裕治、Musleh Uddin、高嶋康晴）

2　脂質等の生体成分による養殖魚判別技術の開発

ア　研究目的

一般に、養殖魚の肉質は天然魚のそれと異なり、食味が悪いとされ、価格に大きな開きがある。JAS 法により養殖魚はその旨を表示することが義務づけられているが、養殖魚と天然魚は、形態等の観察で相違を明らかにすることが難しく、表示の適正さの検証が困難となっている。養殖魚と天然魚の食味相違の原因に、含まれる脂肪の含量が上げられ、特に養殖魚は成長効率を良くするため、脂質の多い餌飼料を用いることから脂肪過多となり、食味の悪化を来すとされる。

本課題ではヒラメを対象として脂質や脂肪酸の含量や種類について詳細に検討し、養殖魚及び天然魚

での脂肪の量や質の相違を明らかにする。そのため、脂質組成や脂肪酸組成などについて調べ、両者の特徴を明らかにし、養殖魚と天然魚の判定を試みる。さらに、判定に使用できる新たな鍵脂質を探索する。これらを総合し、天然魚と養殖魚の判定手法を開発する。

イ　研究方法

(ｱ) 試料と脂質の抽出及び脂質含量

由来の明らかな養殖ヒラメと天然ヒラメを各地から購入し、黒皮普通筋の各部位（頭部背側普通筋－胸ビレ付け根上部から背ビレ中央部までー、尾部背側普通筋－背ビレ中央部から尾柄部までー、腹側普通筋－尻ビレ中央部から尾柄部までー）及び白皮背側普通筋（－胸ビレ付け根上部から背ビレ中央部までー）を細砕後、Folch の手法（*1）に類似し、クロロホルムーメタノール混合溶媒を用いて、粗製脂質を抽出し、養殖魚・天然魚それぞれの脂質含量を測定、比較する。

(ｲ) 脂質クラスの分画

得られた粗製脂質を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（Merk、Kiesel Gel、70-230mesh）で分離し、ワックスエステル（ジクロロメタン／n-ヘキサン：2/3）、ステリルエステル（ジクロロメタン／n-ヘキサン：2/3）、トリアシルグリセロール（TAG、ジクロロメタン）、ステロール類（ジクロロメタン／エーテル：35/1）、ジアシルグリセロール（ジクロロメタン／エーテル：9/1）、遊離脂肪酸（ジクロロメタン／メタノール：9/1）、ホスファチジルエタノールアミン（PE、ジクロロメタン／メタノール：1/1）、ホスファチジルコリン（PC、ジクロロメタン／メタノール：1/20）などの各脂質クラスを得る。

(ｳ) 脂肪酸組成、特有成分などの分析・化学構造の決定

単離精製された TAG やリン脂質（PE や PC）などのグリセリド脂質は、メチルエステル化後、ガスクロマトグラフィー分析（0.25mm、0.25μm、30m キャピラリーカラム）により脂肪酸組成を決定する。それぞれの脂肪酸は、標品のメチルエステルと保持時間を比較するとともに、ジメチルオキサゾリン誘導体とし、ガスクロマトグラフィーマススペクトロメトリー分析で、化学構造を決定する。

ウ　研究結果

(ｱ) 試料部位の選定

試料部位の選定は、天然ヒラメを用いた。2004年 6 月､11月､2005年 1 月に茨城県鹿島灘で漁獲された放流魚を含む天然ヒラメの各部位（黒皮頭部背側普通筋、黒皮尾部背側普通筋、黒皮腹側普通筋及び白皮背側普通筋）について、脂質を抽出し、バラツキを比較した（図1402-1）。黒皮腹側普通筋は脂質含量が大きく変動し、個体差が大きいことが明らかとなった。一方、背側部位はいずれも、バラツキが少なく、黒皮頭部背側普通筋、黒皮尾部背側普通筋がサンプル量もあり、相当量の脂質も確保された。分析部位として、黒皮頭部背側普通筋を用いることに決定した。

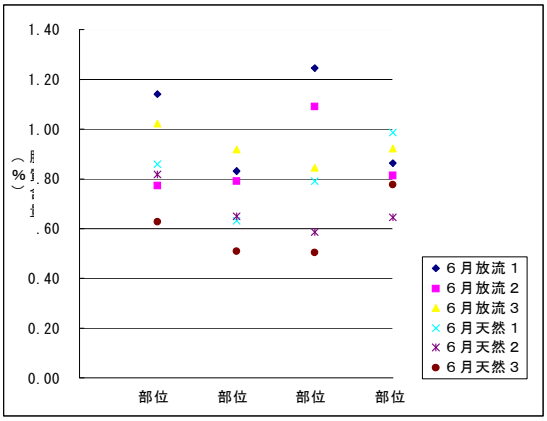


図1402-1 ヒラメ筋肉中の脂質含量(天然魚6月)
部位1:黒皮頭部背側普通筋
部位2:黒皮尾部背側普通筋
部位3:黒皮腹側普通筋
部位4:白皮背側普通筋

(ｲ) 脂質含量の天然・養殖の比較

天然魚、養殖魚それぞれの脂質含量を比較した（表1402-1）。その結果、12月の養殖魚（1.5±0.1%）でやや高い傾向が示されたが、有意差は見出されず、天然魚を含め、すべての試料で、個体間のバラツキ範囲内であり､脂質含量（0.2～1.5%）は判別の決め手にはならないことが明らかとなった。また、天然魚（0.2～0.8%）と放流魚（0.2～1.0%）に脂質含量差は全くみられなかった（表1402-2）。

表1402-1　試験ヒラメ脂質のクラス分け

Scientific name	Sampling No.	Date	Locality		Replicate animals (n)	Length (mm)	Weight (g)	Lipid contents (%)
Paralichthys olivaceus								
Wild	1	July 29th, 2004	35°40'N 140°50'E	Kashima-Nada	3	474 ± 7	1929 ± 73	0.8 ± 0.1
	2	November 4th, 2004	35°40'N 140°50'E	Kashima-Nada	3	408 ± 4	1188 ± 85	0.5 ± 0.0
	3	January 20th, 2005	35°40'N 140°50'E	Kashima-Nada	3	423 ± 9	1260 ± 57	0.6 ± 0.1
	4	July 11th, 2005	35°40'N 140°50'E	Kashima-Nada	5	383 ± 8	952 ± 40	0.6 ± 0.0
	5	October 25th, 2005	35°40'N 140°50'E	Kashima-Nada	3	512 ± 7	2867 ± 209	0.2 ± 0.0
	6	November 29th, 2005	35°40'N 140°50'E	Kashima-Nada	3	543 ± 4	2651 ± 450	0.3 ± 0.0
Planted	1	July 29th, 2004	35°40'N 140°50'E	Kashima-Nada	3	395 ± 5	1218 ± 11	1.0 ± 0.1
	2	November 4th, 2004	35°40'N 140°50'E	Kashima-Nada	3	452 ± 17	1563 ± 201	0.6 ± 0.0
	3	January 20th, 2005	35°40'N 140°50'E	Kashima-Nada	3	405 ± 7	1055 ± 95	0.6 ± 0.0
	4	July 11th, 2005	35°40'N 140°50'E	Kashima-Nada	5	409 ± 9	1219 ± 47	0.5 ± 0.1
	5	October 25th, 2005	35°40'N 140°50'E	Kashima-Nada	3	448 ± 17	2143 ± 315	0.2 ± 0.0
	6	November 29th, 2005	35°40'N 140°50'E	Kashima-Nada	3	573 ± 17	2560 ± 203	0.4 ± 0.0
Aquacultured	1	March 2nd, 2002	33°15'N 132°30'E	Uwa Sea	3	436 ± 9	1337 ± 30	0.7 ± 0.1
	2	December 14th, 2002	33°15'N 132°30'E	Uwa Sea	5	386 ± 3	1231 ± 31	1.5 ± 0.1
	3	August 30th, 2005	33°15'N 132°30'E	Uwa Sea	5	436 ± 9	1337 ± 30	0.7 ± 0.0
	4	November 25th, 2005	33°15'N 132°30'E	Uwa Sea	8	386 ± 3	1231 ± 31	0.5 ± 0.0
	5	December 12th, 2005	33°50'N 129°45'E	Iki island	5	344 ± 8	883 ± 37	0.3 ± 0.0
	6	January 19th, 2006	33°50'N 129°45'E	Iki island	5	350 ± 4	906 ± 32	0.3 ± 0.0

表1402-2　試験ヒラメの生物・漁獲データ

Sample No.	WE [c]	SE [c]	GE [c]	TAG [c]	ST [c]	DG [c]	FFA [c]	PE [c]	PL [c]	PC [c]
Dorsal ordinary muscle										
Wild										
4	0.1 ± 0.0	1.1 ± 0.1	2.3 ± 0.4	28.2 ± 2.0	9.1 ± 1.0	0.5 ± 0.1	1.9 ± 0.1	14.2 ± 0.6	3.0 ± 0.4	39.7 ± 2.5
5	0.6 ± 0.3	1.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	35.4 ± 8.1	11.5 ± 0.5	0.7 ± 0.1	2.9 ± 0.3	10.9 ± 0.8	0.8 ± 0.6	34.8 ± 7.6
6	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.2 ± 0.0	14.8 ± 5.1	8.4 ± 0.2	0.4 ± 0.0	1.7 ± 0.4	11.3 ± 1.2	2.6 ± 0.6	59.6 ± 3.4
Planted										
4	0.1 ± 0.0	1.4 ± 0.1	2.1 ± 0.3	35.0 ± 2.3	9.2 ± 0.8	0.5 ± 0.1	1.7 ± 0.4	11.9 ± 1.0	3.4 ± 0.6	34.8 ± 2.9
5	0.4 ± 0.2	2.0 ± 0.2	0.5 ± 0.1	26.8 ± 5.9	11.7 ± 1.4	0.4 ± 0.1	2.5 ± 0.3	13.3 ± 1.3	1.1 ± 0.1	41.2 ± 3.0
6	0.4 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.2 ± 0.1	19.7 ± 5.3	8.5 ± 0.4	0.4 ± 0.0	1.6 ± 0.1	10.9 ± 0.6	4.1 ± 0.8	53.1 ± 3.5
Cultured										
3	0.1 ± 0.0	1.1 ± 0.2	0.5 ± 0.1	51.5 ± 2.0	7.2 ± 0.2	0.4 ± 0.0	1.2 ± 0.0	8.2 ± 0.4	0.8 ± 0.1	29.0 ± 1.2
4	0.1 ± 0.0	1.0 ± 0.1	0.2 ± 0.1	45.2 ± 2.9	6.7 ± 0.3	0.4 ± 0.0	1.3 ± 0.1	8.2 ± 0.5	1.9 ± 0.4	35.0 ± 1.7
5	0.7 ± 0.4	1.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	21.5 ± 6.8	9.5 ± 0.6	0.4 ± 0.1	3.0 ± 0.4	12.9 ± 0.7	1.9 ± 0.7	48.2 ± 6.1

(ｳ) 脂質クラスの比較

各脂質クラスを比較し、天然・養殖にそれぞれ特徴的なクラスを調べた。両者ともに、トリアシルグリセロールやリン脂質（PE 及び PC）が主成分で、天然魚・養殖魚に有意な差は見出されなかった。以上の結果、脂質クラスによる比較において、判別のための有効なクラスはなかった（表1402-2）。

(ｴ) 脂肪酸類の比較

全脂質の脂肪酸及び分画した脂質クラスの中で、主成分である TAG、PE、PC の脂肪酸類について、それぞれ比較した。

a　全脂質（TL）の脂肪酸の特徴

養殖魚と天然魚について、各脂肪酸の全脂肪酸中の比率を調べた。飽和酸、n-4不飽和酸では、養殖・天然に差が見られなかったが、モノエン酸や、n-3, n-6ポリエン酸に相違が示された。モノエン酸総量を比較した場合、養殖魚は28.5±1.6％と比較的多かったのに対し、天然魚では20.0±2.5％と、少ない傾向を示した。一方、n-3ポリエン酸の総量は養殖魚で36.0±4.0％であったが、天然魚では45.4±6.0％と高い含量を示された。

また、n-6ポリエン酸の総量は、養殖魚5.6±0.2％に対し、天然魚4.8±0.4％と、養殖魚が高い傾向が示された。それぞれの脂肪酸に着目すると、モノエン酸ではオレイン酸（18:1n-9）や20:1n-9が養殖魚に高く、20:1n-11は天然魚に高い傾向が見られた。また、n-3 PUFA においては、イコサペンタエン酸（EPA）、ドコサヘキサエン酸（DHA）ともに天然魚に高く、n-6 PUFA ではリノール酸（LA、18:2n-6）が養殖魚に比較的高く見出された（表1402-3）。

b　蓄積脂質（TAG）等の各クラスの脂肪酸の特徴

養殖魚と天然魚について、TAG や PE、PC 中の脂肪酸組成を調べた。全脂質と同様に、飽和酸、n-4不飽和酸では、養殖・天然に差が見られなかったが、モノエン酸や、n-3，n-6ポリエン酸に相違が示された。特に、TAG に大きな差が見られ、モノエン酸総量を比較した場合、養殖魚は40.3±0.6％と高かったのに対し、天然魚では30.9±1.4％と、低い傾向を示した。また、n-3ポリエン酸の総量でも全脂質と同様の傾向を示し、養殖魚で、25.9±1.8％であったが、天然魚では33.9±3.3％と高い含量を示した。また、n-6ポリエン酸の総量も、全脂質と類似して、養殖魚が高い傾向が示された。各脂肪酸では、モノエン酸ではオレイン酸や20:1n-9が養殖魚に高く、20:1n-11は天然魚に高い傾向が見られた。また、n-3 PUFA においては、EPA 、DHA ともに天然魚に高く、n-6 PUFA ではリノール酸（18:2n-6）が養殖魚に高く見出され、全脂質と同様の結果を得た（表1402-3）。一方、極性脂質である PE や PC では、相違があまり見出されなかった。

表1402-3　試験ヒラメ脂質の脂肪酸組成

	Aquacultured				Wild			
	TL	TAG	PE	PC	TL	TAG	PE	PC
Total saturated	**26.9 ± 3.3**	**25.7 ± 2.2**	**20.1 ± 0.7**	**29.5 ± 3.9**	**26.5 ± 2.9**	**26.9 ± 2.8**	**26.1 ± 6.4**	**29.7 ± 7.2**
14:0	2.7 ± 0.7	4.0 ± 0.7	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.1	2.6 ± 1.0	6.7 ± 1.6	0.4 ± 0.2	1.6 ± 0.3
16:0	19.6 ± 2.5	17.0 ± 1.3	8.7 ± 0.4	26.3 ± 3.8	18.1 ± 2.1	15.6 ± 1.3	11.5 ± 3.4	25.0 ± 6.9
18:0	3.1 ± 0.2	2.5 ± 0.2	9.8 ± 0.4	1.8 ± 0.1	3.9 ± 0.2	2.2 ± 0.2	11.9 ± 2.7	1.8 ± 0.2
Total monoenoic	**28.5 ± 1.6**	**40.3 ± 0.6**	**11.8 ± 0.6**	**12.1 ± 0.6**	**20.0 ± 2.5**	**30.9 ± 1.4**	**13.8 ± 2.7**	**11.4 ± 1.3**
16:1n-7	5.1 ± 0.7	8.2 ± 0.6	0.6 ± 0.1	1.1 ± 0.1	3.5 ± 1.4	9.0 ± 1.0	1.0 ± 0.3	1.6 ± 0.5
17:1n-8	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.0
18:1n-9	14.5 ± 0.7	20.2 ± 0.3	5.1 ± 0.2	7.5 ± 0.5	7.3 ± 0.8	9.7 ± 0.7	4.4 ± 1.1	5.5 ± 0.9
18:1n-7	3.3 ± 0.4	4.1 ± 0.2	3.0 ± 0.1	1.6 ± 0.1	2.5 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.5 ± 0.7	1.3 ± 0.1
20:1n-11	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	1.6 ± 0.4	2.6 ± 0.6	1.4 ± 0.3	0.7 ± 0.1
20:1n-9	1.7 ± 0.2	2.4 ± 0.2	1.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.7 ± 0.3	0.4 ± 0.1
20:1n-7	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.0
22:1n-11	1.2 ± 0.2	1.7 ± 0.2	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	1.4 ± 0.3	1.9 ± 0.6	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2
22:1n-9	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1
Total polyenoic	**42.8 ± 4.0**	**32.7 ± 2.0**	**62.3 ± 3.7**	**57.0 ± 4.2**	**51.7 ± 4.8**	**40.8 ± 3.3**	**53.8 ± 10.3**	**56.2 ± 3.5**
Total n-4 polyenoic	**1.2 ± 0.1**	**1.5 ± 0.1**	**1.8 ± 0.8**	**0.7 ± 0.1**	**1.4 ± 0.4**	**2.8 ± 0.5**	**1.5 ± 0.5**	**0.9 ± 0.1**
16:2n-4, 7	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.2	1.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Total n-6 polyenoic	**5.6 ± 0.2**	**5.4 ± 0.3**	**5.7 ± 0.3**	**5.8 ± 0.2**	**4.8 ± 0.4**	**4.1 ± 0.2**	**4.8 ± 0.5**	**4.5 ± 0.3**
18:2n-6, 9	1.9 ± 0.1	2.6 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0
20:4n-6	1.9 ± 0.1	1.3 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.0 ± 0.2	1.2 ± 0.1	2.6 ± 0.3	2.1 ± 0.2
22:5 n-6	0.7 ± 0.2	0.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.9 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1
Total n-3 polyenoic	**36.0 ± 4.0**	**25.9 ± 1.8**	**54.8 ± 4.2**	**50.6 ± 4.2**	**45.4 ± 5.0**	**33.9 ± 3.3**	**47.4 ± 10.3**	**50.8 ± 3.6**
18:4n-3	0.7 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.2	2.3 ± 0.4	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.1
20:5n-3	7.5 ± 0.7	8.6 ± 1.1	4.1 ± 0.3	7.7 ± 0.4	8.4 ± 1.0	12.8 ± 1.8	5.2 ± 1.9	9.1 ± 0.3
22:5n-3	3.0 ± 0.4	3.1 ± 0.4	3.1 ± 0.3	3.4 ± 0.4	3.3 ± 0.4	3.6 ± 0.7	2.5 ± 0.4	3.0 ± 0.6
22:6n-3	24.0 ± 2.8	11.1 ± 1.6	47.1 ± 3.9	38.9 ± 3.8	32.0 ± 4.2	13.2 ± 2.3	39.0 ± 8.3	37.9 ± 3.2
Total fatty acids	**98.2 ± 1.5**	**98.8 ± 0.2**	**94.2 ± 3.1**	**98.6 ± 0.2**	**98.2 ± 0.8**	**98.7 ± 0.7**	**93.8 ± 3.6**	**97.4 ± 5.5**

エ　考　察

上記の結果、脂質含量や脂質クラスによるヒラメの養殖・天然の判別は難しいことが分かったが、脂肪酸組成を詳細に調べることにより判別の鍵となる数種の脂肪酸類を見出すことができた。特に、蓄積脂質である TAG や TL に天然・養殖の差が顕著に現れることが分かった。この原因は、蓄積脂質やその影響受ける全脂質は、直接餌由来の脂質成分を反映しているためと推定された。一方、組織脂肪として重要な PE や PC では、環境や餌の影響が低いと考えられた。

オ　今後の課題

(ｱ) ヒラメの養殖・天然の判別

ヒラメにおいて天然・養殖判別の有望なマーカー脂肪酸を見出したものの、まだデータの蓄積が必要である。

(ｲ) 他の魚種への応用

同様にして、脂肪酸の特徴を正確に把握することにより、他の魚種でも天然・養殖判別の可能性が見出された。

カ　要　約

(ｱ) 脂質含量については天然・養殖で顕著な差が

見られなかった。

(ｲ) 脂質クラスについては、天然・養殖ともに類似し、差が見出されてなかった。また、マーカーとなる脂質クラスや特殊な脂質も見出されなかった。

(ｳ) 脂肪酸組成では総脂質 (TL)、蓄積脂質 (TAG) に関して、多数の脂肪酸にそれぞれの特性が見出された。モノエンのオレイン酸 (18:1n-9) 量、20:1n-11及び20:1n-9比、リノール酸 (18:2n-6) 量、EPA (20:5n-3)、DHA (22:6n-3) 量とも差が見出され、マーカーとなる可能性が示された。

(ｴ) 単独の脂肪酸だけでは判別に対して絶対的とは言えないが、数種の脂肪酸を組み合わせることにより、判別の可能性が示唆された。

キ　引用文献

齋藤洋昭 2004. 食物連鎖からみた水産脂質. 平成16年度水産学会春季大会要旨集. 328.

齋藤洋昭 2004. 食物連鎖における水産脂質の動態. 水産機能性脂質－給源・機能・利用－. 高橋是太郎編. 日本水産学会監修. 恒星社厚生閣. 9-27.

齋藤洋昭 2005. 付加価値の高い養殖魚. 養殖. 緑書房. 42. 88-91.

齋藤洋昭 2006. 天然・養殖の判別：ヒラメにおける考察. 第 9 回マリンバイオテクノロジー学会大会要旨集. 100.

研究担当者（齋藤洋昭*、桑原隆治）

3　化学分析法による放射線照射肉類の検出

ア　研究目的

近年、米国等では、衛生化を目的とした食肉の照射が許可・実施されている。殺菌を目的とした食品照射の国内導入は現時点で禁止されているため、輸入食品の履歴保証の点から、放射線照射の有無を検出する技術（検知技術）の確立が必要である。本研究では、肉類を対象に DNA コメットアッセイと化学分析法の分析条件、適用範囲を検討し、両者を組み合わせて照射の有無を判定するシステムを確立する。

イ　研究方法

(ｱ) DNA コメットアッセイによるスクリーニング

a　試料および照射

豚肉及び鶏肉は精肉店より新鮮なものを入手した。牛肉については、食肉処理後 1 ヶ月経過したオーストラリア産チルド（ 0 ℃）保存、及びと畜した新鮮なホルスタイン牛を入手して用いた。と畜後の牛肉は、 4 ℃の冷蔵庫で貯蔵し、一定期間後の非照射試料についても分析を実施した。試料の照射は食品総合研究所の60-Co 線源（ｶﾞﾝﾏｾﾙ220）を用い、大気中 0 ℃または-18℃で0. 5～ 5 kGy で行った。照射後の試料は、-30℃で保存した。

b　DNA コメットアッセイ

ヨーロッパ標準分析法、EN13784 (Anonymous 2001) に従い、凍結した 1 g の試料を砕片し10ml の緩衝液中で 5 分撹拌後、250ミクロンのメッシュで濾過して細胞懸だく液を得た。これをスライドグラス上、0. 8％の低融点アガロースに包埋し、2. 5％SDS で Lysis をおこない中性条件で電気泳動した。泳動後のスライドは、 1 mM のヨウ化プロピルで染色し、蛍光顕微鏡で観測した。

c　画像解析

得られた蛍光顕微鏡で画像は、コメットアナライザ (youworks　ver20040203) を用いて解析した。1 検体当たり100個以上の電気泳動像について、細胞全長や損傷領域の蛍光強度比等のパラメータを計算した。

(ｲ) 化学分析法による照射肉類の分析

a　試料および照射

コメットアッセイと同様、小売店で購入した鶏肉及び豚肉試料を食品総合研究所の60-Co 線源（ｶﾞﾝﾏｾﾙ220）を用い、大気中 0 ℃または-18℃で0. 5～ 5 kGy で照射した。

b　試料の前処理

試料の前処理は、田邉らの改良法（田邉2002）に準じて行った。すなわちヘキサンを溶媒としたソックスレー抽出法により抽出した脂質、200mg を、20％の含水率で不活性化したフロリジルに添加し、ヘキサン60ml で溶出した分画を炭化水素分析に、さらに90ml のヘキサンで溶出の後、ヘキサン/エーテル＝98/ 2 (v/v) の溶媒120ml で溶出する分画を集めて 2 －アルキルシクロブタノン分析に用いた。

c　炭化水素及び 2 －アルキルシクロブタノンの定量

炭化水素の検出は、CEN 標準分析法：EN1784（Anonymous 2003a)、に準じ、エイコサンを内部標準として定量した。 2-アルキルシクロブタノンは、CEN 標準分析法：EN1785（Anonymous 2003b）に順じ、シクロヘキシルヘキサノンを内部標準として GC/MS により、TIC および SIM（M/Z=98)モードで

を定量した。

ウ　研究結果

(ｱ) DNA コメットアッセイによるスクリーニング

コメットアッセイの解析ソフトを Youworks と共同開発し、鶏肉、豚肉、牛肉についての適用性を確認した。この解析ソフトを用いること、100枚の画像を120秒程度で自動一括処理（細胞の探索と認識、核と損傷部の自動判定、パラメータ計算）することができた。コメット画像と解析例を示す（図1403-1）。解析パラメータのうち、コメット全長(Tail length)は、線量に対して頭打ちの傾向を示したが、非照射 1 kGy 以上の照射との差が大きく、照射の判別に有効であることが示された（図1403-2)。また、Tail Moment のパラメータは、線量に対して良好な直線関係を示し、線量推定に有効であった（等々力ら2004)。

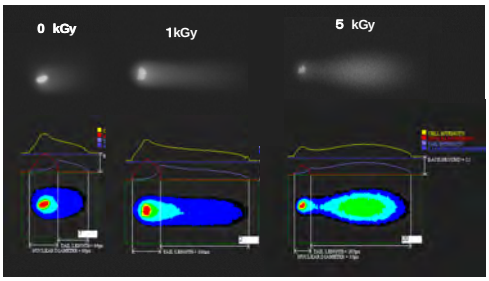


図1403-1　コメット画像と解析例
1)豚肉 1，3，5 kGy（0℃）

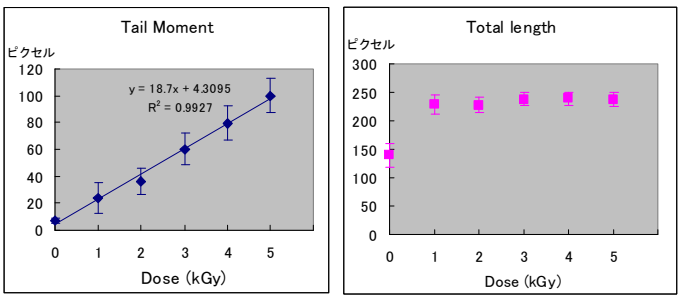


図1403-2　パラメータの線量依存性
1)ﾓｰﾒﾝﾄ(Tail Moment)左 2)ｺﾒｯﾄ全長(Totallength)右

照射以外のファクターでの DNA 切断の可能性を調べるため、特に熟成期間の長い牛肉について、と畜直後と 4 ℃で貯蔵後に経時的に DNA コメットアッセイを行ったところ、貯蔵期間とともに損傷を示す細胞の割合が増えたが、と畜14日後までは、一部の細胞が新鮮な非照射細胞が示す損傷の無い泳動像を示しており、細胞集団全体についてコメット全長をパラメータとした頻度分布を調べると、照射の場合の分布と区別出来た。また、チルド保存（1ヶ月）の牛肉でも照射試料との区別が可能であった（図1403-3)。

(ｲ) 化学分析法による照射肉類の分析

照射肉からは、トリグリセリドの構成脂肪酸に由来する特徴的な炭化水素類が検出された。特に、脂肪酸組成の高い、オレイン酸からは、8-Heptadecene（HC17：1）及び1,7-hexadecadiene（HC16：2)、パルミチン酸(23.2%)からは、n-pentadecane（HC15：0）及び 1 -tetradecene（HC14：1）が検出された。また、2-アルキルシクロブタノンの分析では、パルミチン酸由来の2-dodecylsyclobutanone(2-DCB)および、ステアリン酸由来の2-tetradecylclobutanone(2-TCB)を線量依存的に検出することが出来た。鶏肉及び豚肉を 0 ℃及び-18℃で照射した際の両物質の生成量を示す（図1403-4）（図1403-5)。

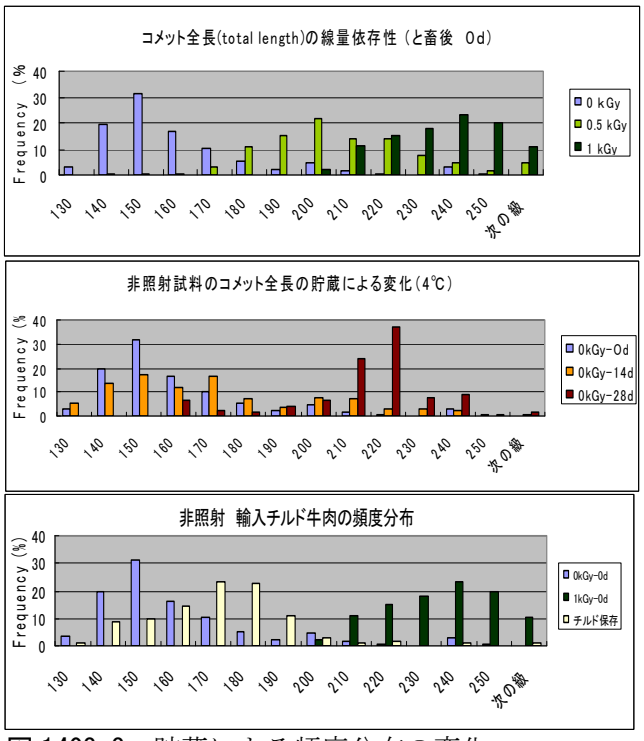


図 1403-3　貯蔵による頻度分布の変化
1)新鮮な牛肉の照射時のｺﾒｯﾄ全長(上)
2)牛肉貯蔵時のｺﾒｯﾄ全長の頻度分布(中)
3)ﾁﾙﾄﾞ(0℃)貯蔵一ヶ月の牛肉と照射(1kGy)の比較(下)
4)横軸はﾋﾟｸｾﾙ数で表した細胞の長さ(1 ﾋﾟｸｾﾙ＝1.3μm)

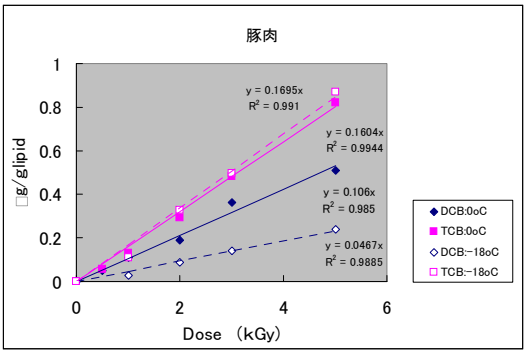


図1403-4　豚肉のシクロブタノン量

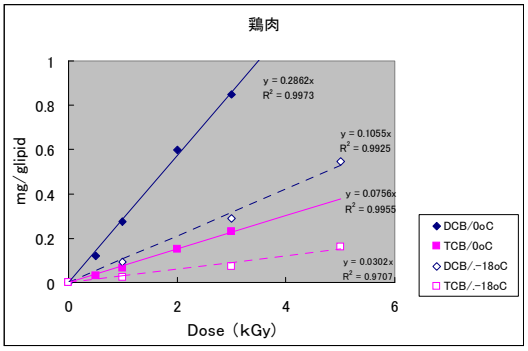


図1403-5　鶏肉のシクロブタノン量

エ 考 察

(ｱ) DNA コメットアッセイによるスクリーニング

DNA コメットアッセイは、スクリーニング法として利用でき、その判別方法は、肉眼観察で一様に損傷細胞が観察されたら照射の疑いがありとするものである。非照射の細胞については、損傷無しの細胞が混じっていれば照射の可能性は排除される。ただし、冷蔵や冷凍で長期保存した場合に DNA 鎖切断がおきるため、一見しただけでは、照射試料との判別が難しい。Cerda らは長期貯蔵した場合のコメット観察では、肉の DNA 損傷に加え、増殖した微生物も染色観察されることで区別出来ると報告している。しかし、衛生的に処理された非照射の輸入チルド牛肉を分析した結果では、微生物は観測され無かった。一方で、コメット像の損傷は一見しただけでは放射線による損傷の場合との区別できなかった。

そこで、と畜直後の新鮮な牛肉の放射線照射によるコメット像の変化について、コメット全長の頻度分布のパターンを画像解析ソフトを用いて求めた。照射の場合、0.5kGy でも170ピクセル未満の長さの細胞が観測されなくなったのに対し、照射14日までの自己消化による DNA 損傷の場合では、これよりも損傷の小さい細胞が観測され、照射の場合の頻度分布のパターンと明確に区別された。同様にチルド牛肉（0℃1ヶ月保存）についても損傷の少ない細胞が残存し、コメット全長の頻度分布のパターンからから、非照射試料との判別が可能であった。画像解析ソフトを用いることで判別精度の向上が見込まれた。

(ｲ) 化学分析法による照射肉類の分析

これまで、報告されているように炭化水素及び2－ドデシルシクロブタノン及び2-テトラデシルシクロブタノンが照射肉類の照射判別の指標として有用なことが確認された。ただし、飽和炭化水素の場合、使用ガラス器具の洗浄を充分にしたり、プラスチック製のほ包装材との接触を避ける等の注意を払わないとコンタミネーションがおこり、非照射試料にも多量の飽和炭化水素がでてくる可能性がある。その様なことを考えると、より特異性の高い2－アルキルシクロブタノンのみを正確に測定することを、食肉類についての確定的な検知法として用いることが現実的と考えられる。シクロブタノンの生成量については、鶏肉の場合は、生成するシクロブタノン量が前駆体であるトリグリセリドの脂肪酸組成に良く対応していたが、豚肉の場合には、トリグリセリド中でのパルミチン酸量がステアリン酸量より多いにもかかわらず、生成物で2-テトラデシルシクロブタノンの法が多く、こちらを主に照射の判別指標としたほうが、感度的に有利と考えられた。また、豚肉のテトラデシルシクロブタノンの生成は、照射温度の依存性が低く、脂肪酸当たりのシクロブタノンの生成効率を用いれば、未知試料についての線量推定がある程度可能となることが示唆された。

オ　今後の課題

(ｱ) DNA コメットアッセイによるスクリーニング

肉類以外の植物性食品（種子特に香辛料）での適用可能性について検討する必要がある。

(ｲ) 化学分析法による照射肉類の分析

肉類の放射線照射検知について、2-アルキルシクロブタノン法は最も特異性の高い判別方法であるが、試料調製法が煩雑であり、迅速に測定出来る前処理法を確立する必要がある。また、食肉以外の適用範囲についても拡大してゆく必要がある。

カ　要　約

(ｱ) DNA コメットアッセイによるスクリーニング

照射肉類のコメットアッセイに適したコメットアッセイの解析ソフトを共同開発し、鶏肉、豚肉、

牛肉についての適用性を確認した。

(ｲ) 化学分析法による照射肉類の分析

炭化水素法、シクロブタノン法の分析手法を確保し、炭化水素法では、8-Heptadecene（HC17：1）及び1，7-hexadecadiene（HC16：2）、シクロブタノン法においては、鶏肉において2-DCB、豚肉については2-TCB が照射の指標として有効であることを確認した。

キ　引用文献

Anonymous 2003a EN 1784. Foodstuffs. Detection of irradiated food containing fat. Gas chromatographic analysis of hydrocarbons.

Anonymous 2003b EN 1785. Foodstuffs. Detection of irradiated food containing fat. Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of 2-alkylcyclobutanones .

Tanabe, H et al 2002. Radioisotopes, 51, 109-112

等々力ら　2004. DNA コメットアッセイによる放射線照射食肉の検知　食品成果情報第16号　26-27。

研究担当者（等々力節子*）

4　近赤外分光法を用いた残留農薬簡易迅速測定システムの開発

ア　研究目的

日常的に食卓の上る農産物のロットのすべてが残留農薬検査を受けるまでには至っていない。そこで、本課題では、残留農薬分析業務の迅速化・省力化を図るため公定法を適用する前段階のスクリーニング技術を開発することを目途に、近赤外分光法を用いた残留農薬簡易・迅速分析法の開発を目的とした。

イ　研究方法

(ｱ) 果菜類表皮に残留した農薬の回収方法及びその回収率

洗浄液で果実表皮を洗浄する方法について検討した。また、農薬モデル液（商品名：ユーパレン、農薬：ジクロフルアニド）をトマト試料に散布し、散布前後の果実重量から農薬付着量を算出、また洗浄液の量・農薬濃度から回収農薬量を求め、その比率から回収率を算出した。農薬濃度の測定には HPLC を用いた。

(ｲ) ガラス製ろ紙による濃縮の効果

残留農薬を洗浄･回収した洗浄液の濃縮を次の方法により行い、ろ紙を乾燥(45℃、60min)した後、分散型近赤外装置(NIRSystems 社製、6500)を用い拡散反射法により乾燥ろ紙の近赤外スペクトルを測定、そのスペクトルと化学分析値を基に PLS 回帰分析を行い、測定精度の比較を行った。

a　従来法の DESIR：0.3mL の洗浄液をろ紙へ添加・乾燥。

b　浸 漬 法：ろ紙を洗浄液へ浸漬。約0.6mL の洗浄液が付着。その後乾燥。

c　蒸散法Ａ：プラスチック製シャーレ(内径、ろ紙の径に一致)にろ紙を敷き 2 mL の洗浄液を添加・乾燥

d　蒸散法Ｂ：ガラス製シャーレ(内径、ろ紙の径より 2 mm 大きい)にろ紙を敷き 2 mL の洗浄液を添加・乾燥

(ｳ) フィールド模擬実験

実際の現場での残留農薬試験を想定し、トマト果実を用いたフィールド模擬試験を行った。すなわち、トマトに残留した農薬を(ｱ)の方法により洗浄で回収し、(ｲ)の c の方法により残留農薬を回収した洗浄液の濃縮を行い、ろ紙を乾燥(45℃、60min)した後、分散型近赤外装置(NIRSystems 社製、6500)を用い拡散反射法により乾燥ろ紙の近赤外スペクトルを測定、そのスペクトルと化学分析値を基に PLS 回帰分析を行い、測定精度(限界)の確認を行った。

(ｴ) 測定システムの妥当性確認

同一の農薬モデル液(Acephate)を用いて、研究機関間及び分析者間の測定精度の違いを求めることにより、開発した残留農薬簡易迅速測定システムの妥当性確認を行った。

(ｵ) 農薬の種類の測定精度へ及ぼす影響

三種類の農薬(Acephate, Dichlofluanid, TPN)を用い、蒸散法Ａにより農薬アセトンモデル液の濃縮を行い、前述した方法によりスペクトル測定及び解析を行った。

ウ　研究結果

(ｱ) 果菜類表皮に残留した農薬の回収方法及びその回収率

チャック付きポリエチレン袋(140×200×0.04mm)に農薬モデル液を付着したトマト果実(130～200g)及びアセトン(１回目25mL 及び２回目15mL)をいれ、同袋を揉むようにして農薬を回収する方法を考案した(写真1404-1)。残留農薬の回収率は約90%であった。

(ｲ) ガラス製ろ紙による濃縮の効果

色々な方法で濃縮・乾燥した残留農薬付着ろ紙のスペクトル(図1404-1)と化学分析値を基に行ったPLS回帰分析の結果を表1404-1示した。蒸散法Aにおいて良好な精度が得られ、その予測標準偏差(SEP)は6.1ppmであった。

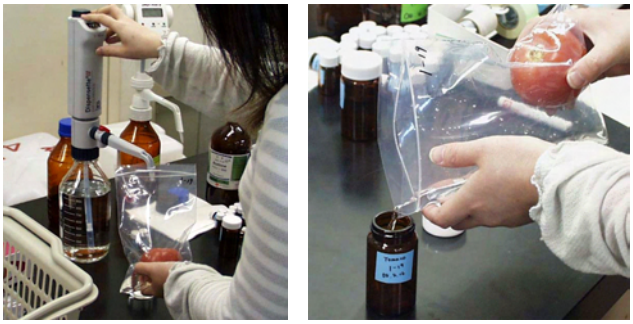


写真1404-1　による残留農薬の洗浄・回収

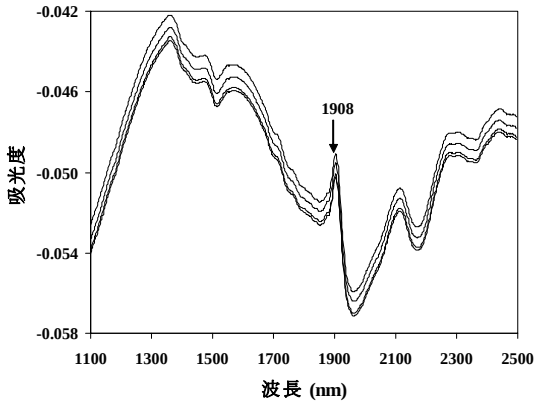


図1404-1　乾燥ろ紙の近赤外スペクトル

表1404-1 ｼﾞｸﾛﾌﾙｱﾆﾄﾞ測定用PLS検量線の解析結果

	F	R	SEC	SEP	Bias
従来法	4	0.96	7.5	9.9	-2.4
浸漬法	3	0.98	5.3	6.6	2.1
蒸散法-A	5	0.98	4.8	6.1	-0.1
蒸散法-B	4	0.96	7.2	7.3	0.2

F：ファクター数、R：重相関係数
SEP：予測標準誤差(ppm)
Bias：バイアス(ppm)
SEC：検量線開発時の標準誤差(ppm)

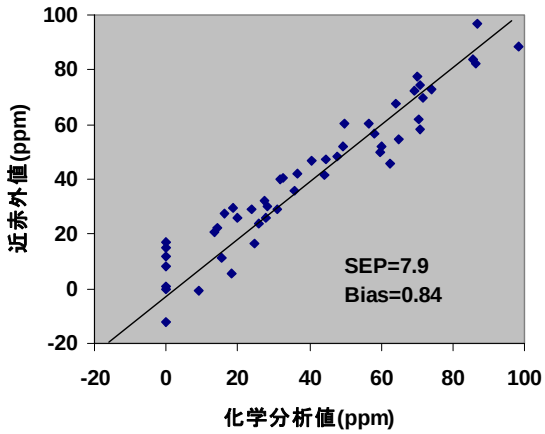


図1404-2　ｼﾞｸﾛﾌﾙｱﾆﾄﾞの近赤外測定値と化学分析値の関係

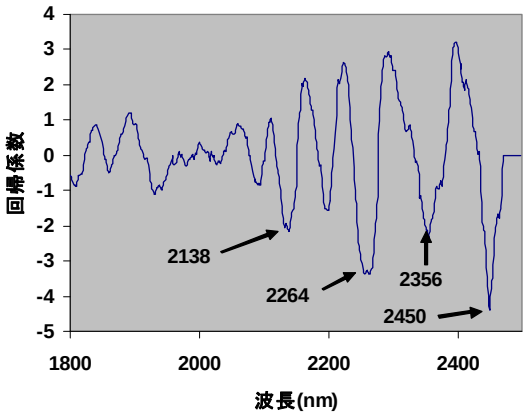


図1404-3　検量線の回帰係数のﾌﾟﾛｯﾄ

(ｳ) フィールド模擬実験

得られた結果を図1404-1、図1404-2、図1404-3に示した。残量農薬の測定精度はSEPで7.9 ppmであった。ここで得られた測定精度を果実重量(200g として)当たりに換算すると測定限界は1.6ppmであった。

(ｴ) 測定システムの妥当性確認

研究機関間では測定値にバイアスが発生したものの、バイアス補正後の測定精度はほぼ同等であったのに対し、分析者間では個人差の影響が大きく現れた。従って、測定に際し分析者の多少の訓練が必要である(図1404-4)。

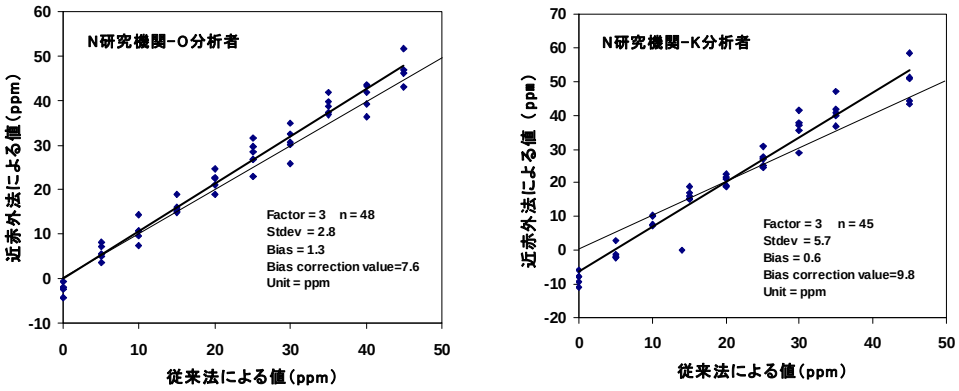


図1404-4 Acephate モデル水溶液を用いて妥当性確認を行った結果

表1404-2 3 種類の農薬測定用の PLS 解析結果

	F	R	SEC	SEP	Bias
Acephate	3	0.98	2.6	2.1	0.2
Dichlofluanid	7	0.96	4.1	5.1	0.1
TPN	6	0.85	8.0	9.3	1.1

TPN：Tetrachloro-isophthalonitrile
F：ファクター数、R：重相関係数
SEC：検量線開発時の標準誤差(ppm)
SEP：予測標準誤差(ppm)
Bias：バイアス(ppm)

(ｵ) 農薬の種類の測定精度へ及ぼす影響

PLS 解析による結果を表1404-2に示す。測定精度は Acephate で最も高く(SEP が最も小さく)、次いで Dichlofluanid、TPN で最も低くなった。Acephate で SEP は2. 1ppm であった。

エ　考　察

(ｱ) 蒸散法Ａが蒸散法Ｂより精度が高くなった理由はろ紙のサイズとシャーレの内径が一致し、測定に用いた洗浄液(２mL)が効率よくガラス製ろ紙に付着したためと考えられる。また、蒸散法Ａのプラスチック製シャーレの素材はポリスチレンであり、洗浄液のアセトンに多少溶解し、このことが測定精度と何らかの関係があるものと考えられる。

(ｲ) 開発した検量線の回帰係数のいくつかのピークと農薬の吸収バンドが一致することから、近赤外分光法よる測定システムは、内部相関による間接測定ではなく、直接的に残留農薬を測定しているものと考えられた。

(ｳ) 模擬実験の SEP の値はモデル液を用いた実験のそれより大きくなった理由は対照成分値の誤差が大きくなったためである。

(ｴ) CH などの官能基が多く含まれる Acephate の測定精度は高いが、そうでない成分の測定精度は低かった。本システムは分子吸光係数が大きい成分の迅速測定に最適である。

オ　今後の課題

現場で誰でも容易に利用できるようにするため、専用の分析装置の開発及びシステムの構築が必要である。

カ　要　約

青果物の表皮に残留した農薬をアセトンを用いて洗浄・回収し、洗浄液をガラス製ろ紙にしみ込ませ、乾燥したろ紙のスペクトルを測定することにより、残農農薬の濃度を簡易・迅速に測定する方法を確立した。本方法は「残留農薬検出方法」として特許出願した。

キ　引用文献

河野澄夫、ｼﾘﾝﾅﾊﾟｰ ｻﾗﾝｳｫﾝｸﾞ 2006. 残留農薬検出方法，特願2006-092087

S. Saranwong and S. Kawano 2005. Rapid determination of fungicide contaminated on tomato surface using DESRI-NIR Spectroscopy: a system for ppm-order concentration, J. Near Infrared Spectrosc., 13, 169-175

研究担当者（Sirinnapa Saranwong、河野澄夫*）

第 2 編　食品の安全性に関するリスク分析確立のための研究開発

第 1 章　最近判明したリスクの解明と制御およびコミュニケーション

1　食品中のアクリルアミド分析法の改良とその応用

ア　研究目的

アクリルアミドは高温加熱を伴う加工食品に広く見いだされるため、反応機構の解明、低減化技術の開発、家庭内調理や工場における品質管理など、多様な研究目的に対して援用できる分析法を開発する。また、それを通じて本プロジェクトの他の研究課題の推進に貢献する。

イ　研究方法

(ｱ) 多検体分析法の開発

ポテトチップの分析法を再検討し、少量試料で多検体を迅速に分析するために、手法の最適化を行った。さらに、本法の信頼性を確保するため、外部精度管理（技能試験、proficiency test）に参加した。

(ｲ) バレイショの低温貯蔵の揚げ調理後のアクリルアミド濃度に及ぼす影響の解明

バレイショを約20℃の室温と 2 ℃の低温で貯蔵し、糖やアミノ酸含量の変化と、ポテトチップに揚げ加工後のアクリルアミド濃度を調べた。

(ｳ) バレイショにおける還元糖/アスパラギン比と揚げ調理後のアクリルアミド生成量の関係

北海道農業研究センターで育成・収穫した品種や貯蔵条件の異なるバレイショについて、揚げ加工後のアクリルアミド含量を分析し、揚げ加工前のアミノ酸含量、還元糖含量との関係の解析を行った。

ウ　研究結果

(ｱ) 多検体分析法の開発

これまでの市販食品の分析を目的とした方法では、50グラムの試料を処理していたが（吉田ら 2002)、サンプリングに問題が少なく GC-MS の感度が十分であれば、 5 グラム以下まで試料を減らしても分析値が得られるようになった（図2101-1)。

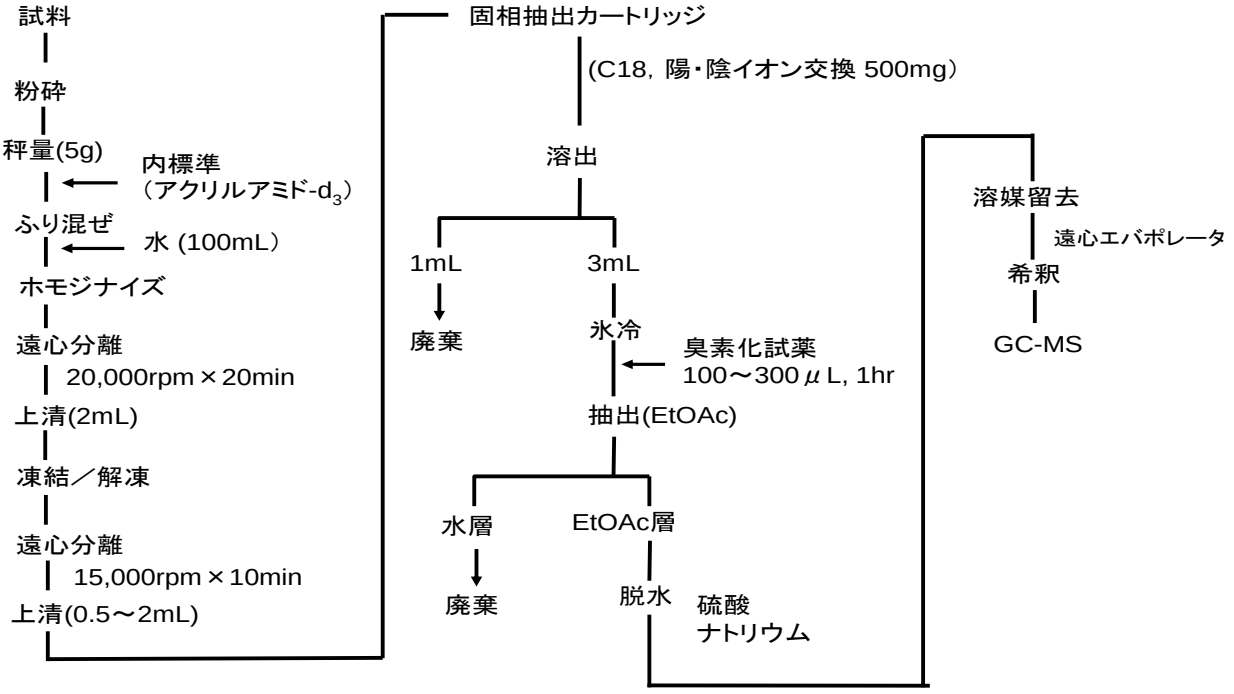


図2101-1　多検体アクリルアミド分析法

この方法を用い、FAPAS の外部精度管理において、ポテトチップ、オーブン加熱調理用フライドポテト、クリスプブレッド、ベビーラスク、朝食シリアル、コーヒー試料について計13回の分析を行い、常に妥当な分析値を得ている。

(ｲ) バレイショの低温貯蔵の揚げ調理後のアクリルアミド含量に及ぼす影響

ここで確立した分析法を用いることにより、１検体あたり数枚のポテトチップから分析値を得ることが可能となった。この方法を用い、約20℃の室温と２℃で低温貯蔵したバレイショから調製したポテトチップ中のアクリルアミド含量を定量し、低温貯蔵による還元糖含量の増加と加工後のアクリルアミド含量に明確な相関があることを実験的に明らかにすることができた（図2101-2）（Chuda ら 2003）。

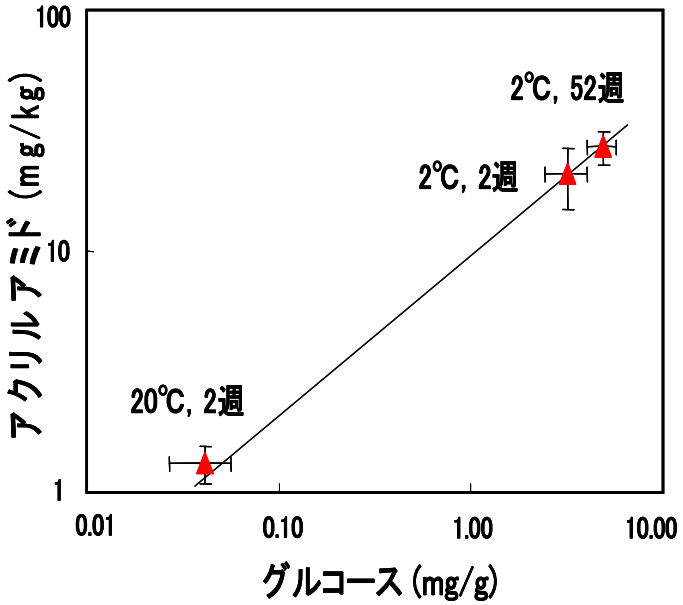


図2101-2　原料イモ中の還元糖含量とポテトチップ中のアクリルアミド生成量（フルクトースもグルコースと同レベル）との相関

なお、低温貯蔵により糖含量の増加したイモから加工したポテトチップは、アクリルアミド含量の増加に加えて焦げ色による色調の著しい悪化が認められた（Chuda ら 2003，Ohara-Takada ら 2005）。

(ｳ) バレイショにおける還元糖/アスパラギン比と揚げ調理後のアクリルアミド生成量の関係

品種や貯蔵条件の異なる388のバレイショ試料について分析を行ったところ、これまでにない広範囲の還元糖含量を有するバレイショに関するデータが得られた。その結果、揚げ加工後のアクリルアミド含有量と生イモ中の還元糖（フルクトース）量の両者をアスパラギンに対する物質量比として規格化してプロットすると、両者の反応率が共に最大となる領域が変曲点として見いだされた（図2101-3）（Matsuura-Endo ら 2006）。このときの最大反応率はアスパラギンが約２％、フルクトースが約１％であり、両者の比（[Fru]/[Asn]）は約２であった。この点を境に、[Fru]/[Asn]比が小さい領域では、フルクトース含量がアクリルアミド生成における制限要因となり、大きい領域ではアスパラギン含量がアクリルアミド生成における制限要因となることが示唆された。

エ　考　察

(ｱ) 多検体分析法の開発

ここで確立された少量試料を用いる分析法は、ポテトチップにとどまらず、フライドポテト、パン類、ビスケット類、朝食シリアル、コーヒーなどにも広く利用できることが示された。また、茶類においては、本法の固相抽出の段階で遅れて溶出するカテキン類を除くことにより、カテキン類による臭素化の阻害を避けてアクリルアミドの分析が可能になった（Mizukami ら 2006）。

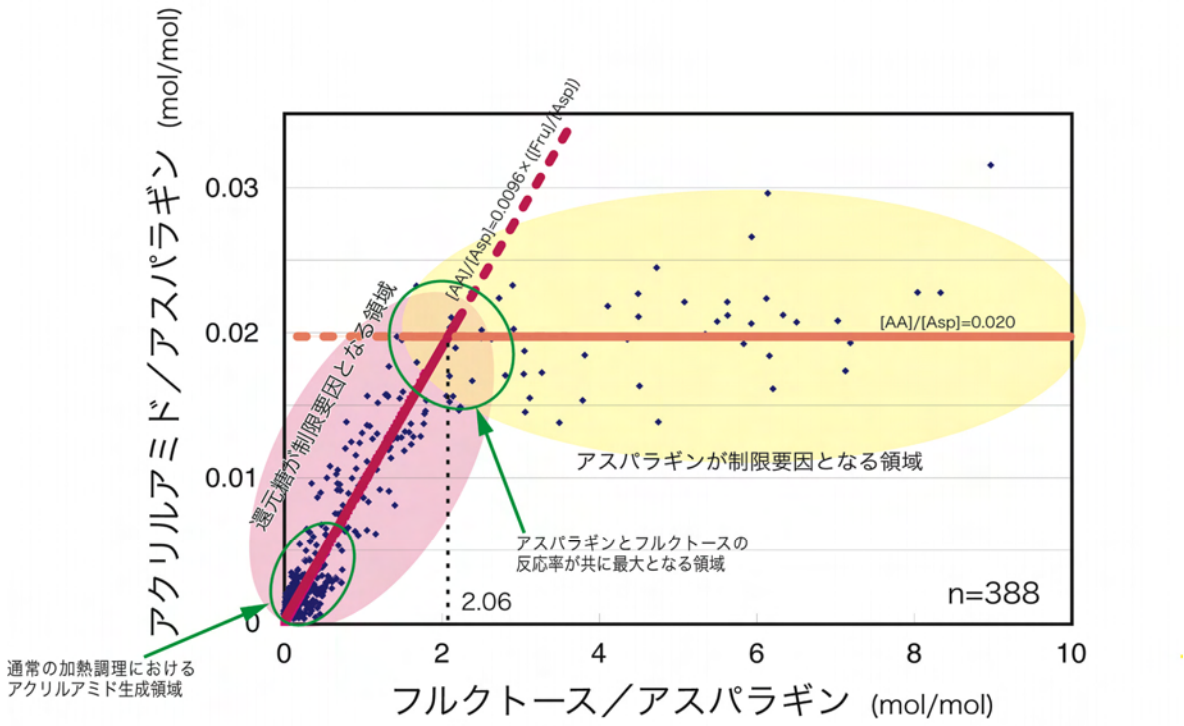


図2101-3　還元糖（フルクトース）／アスパラギンの比率が異なる種々のバレイショの揚げ加工後のアスパラギンのアクリルアミドへの変換率

(ｲ) バレイショの低温貯蔵の揚げ調理後のアクリルアミド含量に及ぼす影響

生のバレイショを低温貯蔵すると糖含量が増えることは以前から知られており、この糖含量の増加により、揚げ加工時にこげやすくなる。そのためポテトチップ製造メーカーでは、揚げ色が悪くなるので原料生イモの低温貯蔵は避けている。生イモの低温貯蔵による糖の増加は、揚げ色の悪化だけでなく、揚げ調理時のアクリルアミド生成を増加させるので、家庭内でも揚げ調理に用いるバレイショの低温貯蔵を避ける配慮が望まれる。

(ｳ) バレイショにおける還元糖/アスパラギン比と揚げ調理後のアクリルアミド生成量の関係

低温貯蔵による極端な糖含量の増加によりアスパラギンがアクリルアミド生成の制限要因になったイモは著しい焦げ色を生じ、通常のポテトチップ加工に用いられることはない。したがって、加工用原料や家庭内調理で消費されるバレイショでは、通常の成分変動の範囲は図1111-3のグラフにおける変曲点の左の領域であり、実質的には糖含量がバレイショ加工品におけるアクリルアミド生成の制限要因となる。

バレイショ以外の農産物でも同様の成分とアクリルアミド生成量の関係が存在するとみられるが、具体的な反応率等は、加工条件や共存成分の影響によって変化すると考えられる。そして、成分変動の範囲が変曲点の左右どちらに分布しているかによって、加熱加工時のアクリルアミド生成の制限要因がアスパラギンか還元糖のいずれかになると考えられる。実際に、本プロジェクト研究の中で、茶（Mizukamiら 2006）やサツマイモ（奥野ら 2006）では、アスパラギンが高温加熱加工時のアクリルアミド生成の制限要因となっていることが明らかになっている。アクリルアミドの低減のためには農産物中の成分変動範囲を考慮した対策が必要である。

オ　今後の課題

(ｱ) 日本型加熱加工食品の一部にもアクリルアミドが含まれているので、これらに関する信頼のおける分析データの蓄積が、日本におけるリスク管理のための基礎として必要である。そこで、分析技術の信頼性確保を目的に、日本型加工食品のアクリルアミド分析標準物質の開発を行う。

(ｲ) これまでに報告されている食品中のアクリル

アミド含有量に関するデータは主に欧米における分析値であり、現在はそれに基づいてリスク評価が行われている。しかし、食べている食材や調理法が欧米とは異なる日本人に、その値に基づいて推定した摂取量をそのまま適用するのは問題がある。そこで、日本におけるトータルダイエットスタディにより、日本人のアクリルアミドの経口摂取量推定を行う。

カ　要　約

(ｱ) 少量の試料を用いた多検体分析に適したアクリルアミド分析法を確立した。本法は、広い範囲の食品における分析に利用できる。

(ｲ) バレイショ生イモの低温貯蔵による還元糖含量の増加と揚げ加工後のアクリルアミド含量に明確な相関があることを実験的に明らかにした。

(ｳ) バレイショにおいては、揚げ加工前のアスパラギン含量が約２％、フルクトース含量が約１％のときに、揚げ加工時の両者の反応率が共に最大となり、このときの両者の比（[Fru]/[Asn]）は約２であった。この点を境に、[Fru]/[Asn]比が小さい領域では、フルクトース含量がアクリルアミド生成における制限要因となり、大きい領域ではアスパラギン含量がアクリルアミド生成における制限要因となるが、アスパラギンがアクリルアミド生成の制限要因になるほど還元糖が多いイモは著しい焦げ色を生じ、通常のポテトチップ加工に用いられることはない。したがって、加工用原料や家庭内調理で消費されるバレイショでは、実質的には糖含量がアクリルアミド生成の制限要因となる。

キ　引用文献

Yoshihiro Chuda・Hiroshi Ono・Hiroshi Yada・Akiko Ohara-Takada・Chie Matsuura-Endo・Motoyuki Mori 2003. Effects of Physiological Changes in Potato Tubers (*Solanum tuberosum L.*) after Low Temperature Storage on the Level of Acrylamide Formed in Potato Chips. Bioscence, Biotechnology, and Biochemistry. 67: 1188-1190.

Chie Mastuura-Endo・Akiko Ohara-Takada・Yoshihiro Chuda・Hiroshi Ono・Hiroshi Yada・Mitsuru Yoshida・Akira Kobayashi・Shogo Tsuda・Shigenobu Takigawa・Takahiro Noda・Hiroaki Yamauchi・Motoyuki Mori. 2006. Effects of Storage Temperature on the Contents of Sugars and Free Amino Acids in Tubers from Different Potato Cultivars and Acrylamide in Chips. Bioscence, Biotechnology, and Biochemistry. 70: 1173-1180.

Yuzo Mizukami・Katsunori Kohata・Yuichi Yamaguchi・Nobuyuki Hayashi・Yusuke Sawai・Yoshihiro Chuda・Hiroshi Ono・Hiroshi Yada・Mitsuru Yoshida. 2006. Analysis of Acrylamide in Green Tea by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54:7370-7377.

Akiko Ohara-Takada・Chie Mastuura-Endo・Yoshihiro Chuda・Hiroshi Ono・Hiroshi Yada・Mitsuru Yoshida・Akira Kobayashi・Shogo Tsuda・Shigenobu Takigawa・Takahiro Noda・Hiroaki Yamauchi・Motoyuki Mori. 2005. Change in Content of Sugars and Free Amino Acids in Potato Tubers under Short-Term Storage at Low Temperature and the Effect on Acrylamide Level after Frying. Bioscence, Biotechnology, and Biochemistry. 69: 1232-1238.

奥野成倫・石黒浩二・吉元誠・甲斐由美・小野裕嗣・箭田浩士・吉田充・忠田吉弘 2006. サツマイモ塊根加熱時のアクリルアミド生成量. 平成17年度研究成果情報（九州地域・全文版）第21号 513-514.

吉田充・小野裕嗣・亀山眞由美・忠田吉弘・箭田浩士・小林秀誉・石坂眞澄 2002. 日本で市販されている加工食品中のアクリルアミドの分析. 日本食品科学工学会誌. 49:822-825.

研究担当者（吉田充*、小野裕嗣、忠田吉弘、箭田浩士）

2　バレイショ加工時のアクリルアミド生成に関わる要因

ア　研究目的

炭水化物を多く含む食材を油加工など高温で加熱すると、発がん性の疑われているアクリルアミド(AA)が生成し、これがポテトチップなどバレイショ加工食品に高いレベルで含まれる場合があることが2002年に報告された（Rosén・Hellenäs2002, Tarekeら2002)。以後、日本国内でも分析法の確立や市販加工食品の分析がすすめられ（Onoら2003)、様々な形で情報が公開されているが、同じ種類の食品でもアクリルアミド量には大きなばらつきがあることがわかっている。日本のチップ原料は、「トヨシロ」等の加工用品種を秋ー翌春までは北海道産を貯蔵して使用、その後の端境期は暖地産から順次北上して使用している。本研究では、品種や貯蔵条件による原料

バレイショ中の成分の違いが、チップ加工時のアクリルアミド生成に与える影響を解明し、加工用高品質品種の育種開発、加工原料イモの管理技術等の基礎的知見を得ることを目的とした。

イ　研究方法

(ｱ) 材料及び貯蔵試験

北海道農業研究センター畑作研究部試験圃場（北海道河西郡芽室町）において、標準耕種法にて栽培・収穫した「トヨシロ」「スノーデン」「らんらんチップ」「男爵薯」「インカのめざめ」を用いた。収穫後、2 週間18℃（暗黒）のキュアリング処理を行い、100ー130g の塊茎を選別して、貯蔵温度 2 、6 、8 、10、18℃（相対湿度80%、暗黒）で貯蔵し、経時的にサンプリングした (3 塊茎 4 反復)。塊茎を縦 2 分割し、半分は直ちにチップ加工後、カラーとアクリルアミド測定に供し、残り半分は薄くスライスし混合して凍結保存（–40℃)、後日各種成分分析に用いた。

(ｲ) チップ加工及び成分分析

チップ加工は北海道農業研究センターばれいしょ育種研究室・標準調理検定法により行った。イモを 1. 3mm 厚にスライスし､180°C 90ー95秒間フライ後、カラーを色彩色差計で測定した。アクリルアミドはチップより水抽出し固相カラムにて精製、臭素化後、GC-MS 法にて分析した。生イモの糖、遊離アミノ酸は、凍結サンプルより80%エタノール抽出し、HPLC 法にて分析した。

ウ　研究結果

(ｱ) 貯蔵温度が塊茎成分およびチップ中のアクリルアミドに与える影響

バレイショ塊茎成分のうち、主要な遊離糖はフルクトース、グルコース、スクロースであり、遊離アミノ酸では、アスパラギンが最も多く、次にグルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、スレオニン、アラニン、バリンなどが挙げられる（Burton1989)。これらの成分を用いたモデル実験により、アスパラギンを還元糖存在下で高温加熱すると、メイラード反応中に十分量のアクリルアミドが生成することが示され、また、量は少ないが、グルタミン、アスパラギン酸によっても生成することが示された（Mottram ら2002, Stadler ら2002)。そこで本研究では、生イモ中のフルクトース、グルコース、スクロース、およびアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸を分析、アクリルアミド生成に関わる成分要因の解明を目指した。

2 ℃貯蔵の「トヨシロ」では貯蔵 3 日目以降、生イモ中の還元糖（フルクトース、グルコース）量の増加がみられ、チップ中のアクリルアミド量も増加することがわかった（Ohara-Takada ら2005)。また、いずれの品種においても 8 ℃未満の温度域で 2 週目以降、還元糖量が増加、チップ中のアクリルアミド量も増加した（図2102-1に18週目の「トヨシロ」「スノーデン」「インカのめざめ」を示す。「男爵薯」は「トヨシロ」と、「らんらんチップ」は「スノーデン」と同様の傾向を示した）（Matsuura-Endo ら2006)。「インカのめざめ」では、18℃貯蔵18週目においてスクロース量が高くなったが、チップ中のアクリルアミド量は他の品種同様低かった。

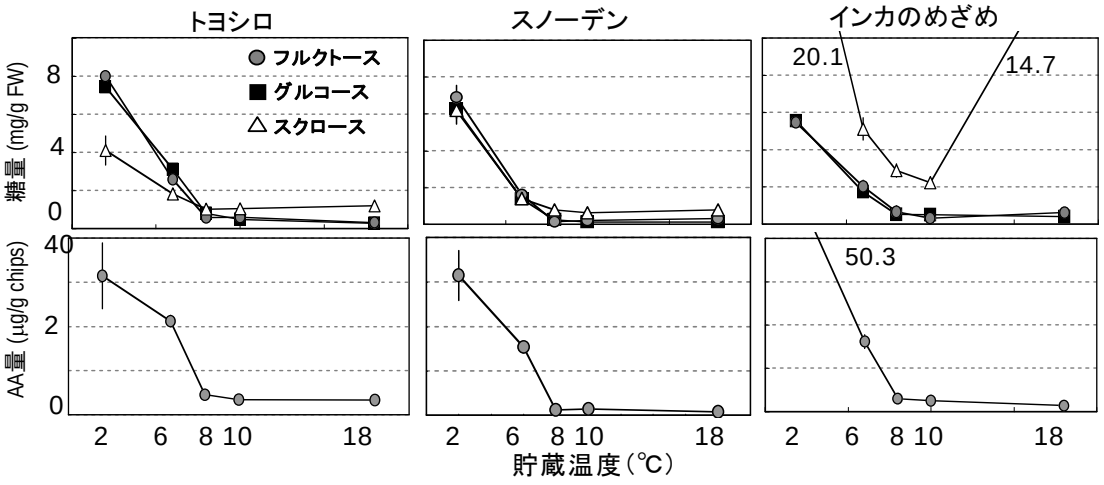


図2102-1 貯蔵温度が塊茎中の糖量とﾁｯﾌﾟ中のｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ(AA)量に与える影響(貯蔵18週目)

調査した4種の遊離アミノ酸については、いずれの品種においてもアスパラギン量が最も高かった。アミノ酸量の貯蔵温度による有意な差は、「トヨシロ」「スノーデン」ではみられなかった。「インカのめざめ」は、他の品種と比べてアスパラギン量が高かった。またこの品種では、貯蔵2週目において、6℃、8℃でアスパラギン、グルタミン量が若干高く、貯蔵18週目ではアスパラギン、グルタミン、グルタミン酸量が高い傾向にあった。

(ｲ) 生イモの成分量とチップ中のアクリルアミド量の関係

チップ中のアクリルアミド量は、生イモ中の各成分のうち、還元糖量の変化ともっともよく対応して変化した。本研究で得られた全データ(n = 387)を用いて、生イモ中の成分量とチップ中のアクリルアミド量の関係を解析すると、還元糖量はアクリルアミド量と高い相関を示した(P < 0.001)：フルクトース－アクリルアミドでは決定係数 R^2 = 0.6968（図2102-2)、グルコース－アクリルアミドは R^2 = 0.6988であった。スクロース量とアクリルアミド量については、R^2 = 0.2397と相関は弱かった(P < 0.001)。スクロースが還元糖と比べて弱い相関となった理由としては、「インカのめざめ」における18℃貯蔵18週目でスクロース量が高かった（図2102-1）点や、いずれの品種においても2℃貯蔵2週目でスクロース量が高かった点などが上げられる。これらのことからも、生イモのチップ加工においては、スクロースのアクリルアミド生成への関与は低いと示唆された。

一方、遊離アミノ酸量とアクリルアミド量の関係は、アスパラギンで決定係数 R^2 = 0.013 (図2102-2)、グルタミン酸 R^2 = 0.0007、グルタミン R^2 = 0.079と有意な相関が見られない(P < 0.05)か、アスパラギン酸 R^2 = 0.33と低かった(P < 0.001)。

これらから、アクリルアミド生成に最も強く関与する生イモ成分は、還元糖であることがわかった。また、モデル実験では、スクロースもアクリルアミド生成に関与できるとされている（Stadler らの2002, Yaylayan らの2003）が、生イモからのチップ加工においては関与は低いことが示唆された。

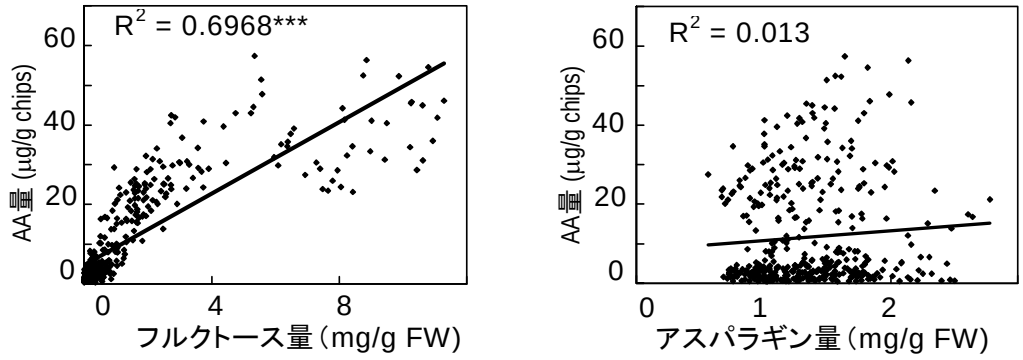


図2102-2　生ｲﾓのﾌﾙｸﾄｰｽ(左)、ｱｽﾊﾟﾗｷﾞﾝ(右)とﾁｯﾌﾟ中のｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ(AA)量
1)　5品種5温度貯蔵0日～18週間、n = 387、***: P < 0.001

(ｳ) チップカラーとアクリルアミド量の関係

チップカラーL*（明度）は、アクリルアミド量と高い相関を示した：R^2 = 0.8708 (n = 387, P < 0.001)。ただし、8℃未満の温度域での貯蔵塊茎から加工されたチップは、いずれの品種においても L* < 54と数値は低く、色相は暗褐色を呈し（図2102-3右に2℃4週貯蔵のトヨシロを示す)、アクリルアミド量も高かった。

図2102-3　貯蔵4週目でのﾁｯﾌﾟｶﾗｰ（ﾄﾖｼﾛ）　1）
左：18℃貯蔵、右：2℃貯蔵

エ　考　察

(ｱ) アクリルアミド量に及ぼす生イモの成分要因

本研究により、いずれの品種においても、２週目以降、８℃未満の温度域で生イモ中の還元糖量が顕著に増加、これに呼応してチップ中のアクリルアミド量も増加すること、還元糖量とアクリルアミド量は極めて相関が高いことがわかった。

興味深いことに、貯蔵２週目では、「スノーデン」「らんらんチップ」においては２℃より６℃の方が還元糖量が高く、また、「トヨシロ」「インカのめざめ」「男爵薯」においては、２℃、６℃で同様の量を示した。チップ中のアクリルアミド量もこれらの還元糖量に対応して変化した。貯蔵４週以降は、いずれにおいても２℃貯蔵の方がイモ中の糖量、チップ中のアクリルアミド量は高かった。この貯蔵２週目の２℃、６℃での糖量の逆転は、温度変化に対する品種間の感受性の差異に起因すると推測される。本研究においては、収穫後18℃２週間のキュアリング処理をおこなった塊茎を、直ちに所定の温度に移している。別の実験において、キュアリング処理後の塊茎を、18℃から10℃へ４週かけて徐々に温度を下げた場合と、直ちに下げた場合とを比較しているが、徐々に下げた塊茎からのチップの方がカラーが良好であり、アクリルアミド量も低いことがわかっている。また、品種によって両者の差が顕著な場合とそうでない場合などの傾向が見られており、これらについては今後、さらに検討していく予定である。

(ｲ) チップカラーによる高アクリルアミド含有チップの判定

本研究において、チップカラーL*（明度）は、アクリルアミド量と高い相関を示すことが明らかとなった。これらから、従来のカラーでのチップ加工用系統の選抜法が、アクリルアミド低生成型系統の選抜においても有効であること、また、メーカーにおけるチップ製造ラインでの不良カラーチップの除去が、製品への高アクリルアミド含有チップ混入を防ぐ上で有効であることが示された。

オ　今後の課題

(ｱ) アクリルアミド低生成型品種・系統の選抜にむけて

現在、さらに約50品種・系統について、成分量とアクリルアミド量の解析を続行しており、これらの知見を、アクリルアミド低生成型品種・系統の選抜に生かしていく予定である。

(ｲ) アクリルアミドを低減できる貯蔵技術の開発にむけて

所定貯蔵温度への緩慢低下など、還元糖量の増加を抑制できる原料イモのハンドリング法を検討中であり、これらの知見を、アクリルアミド低減のための原料イモ貯蔵技術の開発に生かしていく予定である。

カ　要　約

貯蔵温度が原料バレイショ中の成分とチップ中のアクリルアミド量に及ぼす影響を解明するために、5つの品種を５温度条件（２、６、８、10、18℃）にて18週間貯蔵し、生イモ中の糖、遊離アミノ酸量、チップ中のアクリルアミド量を解析し、以下の知見を得た。

(ｱ) 貯蔵温度の影響

いずれの品種においても、２週目以降、８℃未満の温度域で生イモ中の還元糖量が顕著に増加、チップ中のアクリルアミド量も増加した。遊離アミノ酸量は貯蔵温度による顕著な違いはみられなかった。。

(ｲ) アクリルアミド量に及ぼす生イモの成分要因

チップ中のアクリルアミド量は、生イモ中の各成分のうち、還元糖量と高い相関を示した。遊離アミノ酸量は、種類によって有意な相関が見られないか低かった。これらから、アクリルアミド生成に最も強く関与する生イモ成分は還元糖であることがわかった。

(ｳ) チップカラーとアクリルアミド量の関係

チップカラーL*（明度）はアクリルアミド量と高い相関が認められ、従来のカラーでのチップ加工用系統の選抜法が、アクリルアミド低生成型系統の選抜においても有効であること、メーカーにおけるチップ製造ラインでの不良カラーチップの除去が、製品への高アクリルアミド含有チップの混入を防ぐ上で有効であることが示された。

キ　引用文献

Burton, W. G. 1989. The Potato. 第３版. Longman Scientific & Technical 出版社. 286–522.

Matsuura-Endo, C. ら2006. Effects of the storage temperature on the content of sugars and free amino acids in tubers from different potato cultivars and acrylamide in chips. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70:1173-1180.

Mottram, D. S. ら 2002. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. Nature. 419:448–449.
Ohara-Takada, A. ら2005. Change in content of sugars and free amino acids in potato tubers under short-term storage at low temperature and the effect on acrylamide level after frying. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69:1232–1238.
Ono, H. ら 2003. Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese foods. Food Addit. Contam. 20:215–220.
Rosén, J. ・ Hellenäs, K.-E. 2002. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Analyst. 127:880–882.
Stadler, R. H. ら 2002. Acrylamide from Maillard reaction products. Nature. 419:449–450.
Tareke, E. ら 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. J. Agric. Food Chem. 50:4998–5006.
Yaylayan, V. A. ら 2003. Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. J. Agric. Food Chem. 51:1753–1757.

研究担当者（遠藤千絵*、高田明子、小林晃、津田昌吾、瀧川重信、野田高弘、山内宏昭、森元幸、忠田吉弘、小野裕嗣、箭田浩士、吉田充）

3　茶及びその浸出液に含まれるアクリルアミド含有量の把握とその生成要因

ア　研究目的

アクリルアミドは国際がん研究機関により、発がん分類で２A（ヒトに対して恐らく発ガン性がある物質）に分類されており、ポテトチップやフライドポテト、パン、クッキー、朝食用シリアル、コーヒーなど高温で加熱して製造された様々な食材に含まれていることが報告されている(FAO/WHO 2005a)。さらに、食品に含まれるアクリルアミドはアスパラギンと糖のアミノカルボニル反応により生成することも知られている（Friedman 2003)。各種茶類の中でも焙じ茶はコーヒー並のアクリルアミドを含有することが知られているが(FAO/WHO 2005a)、その生成要因は明らかにされていない。また、茶葉には多量のポリフェノール類が含まれており、GC/MS を用いた分析過程においてアクリルアミドの臭素化の妨害要因となる。そこで、ポリフェノールの妨害を回避したアクリルアミドの分析法を確立し、茶葉におけるその生成要因を明らかにする。

イ　研究方法

(ｱ) 茶に含まれるアクリルアミドの分析法を確立するため、GC/MS を用いた分析過程において妨害要因となるポリフェノール類の除去方法を検討する。

(ｲ) 日本産各種茶を収集し、GC/MS により茶及びその浸出液中のアクリルアミド含有量を把握する。

(ｳ) アクリルアミドの生成機構を解明するため、焙煎条件（温度、時間）がアクリルアミドの生成に及ぼす影響を解明する。原料茶葉100g をアルミプレートに入れ、100℃、120℃、140℃、160℃、180℃、200℃ および220℃ でそれぞれ10分、20分および30分焙煎し、アクリルアミドの生成量を把握する。

(ｴ) 原料茶葉のアミノ酸及び糖の組成が焙煎後のアクリルアミドの生成に及ぼす影響を解明する。原料茶葉82サンプルのアミノ酸と糖を分析し、180℃で10分焙じてアクリルアミドの生成量を分析する。アクリルアミドの生成量を目的変数、各アミノ酸含量と糖含量を説明変数として重回帰分析を行い、アクリルアミド生成量に最も関与する成分を分散比と P 値より求める。

(ｵ) アミノ酸類は生葉を貯蔵すると増加することが知られており、このような茶葉を焙煎すると高濃度のアクリルアミドが生じることが予想される。そこで、摘採後の生葉を温度10℃下および25℃から30℃下で24時間貯蔵し、180℃で10分焙煎したもののアクリルアミド含有量を分析する。

ウ　研究結果

(ｱ) 茶に含まれるアクリルアミドの分析法

茶葉に含まれるアクリルアミドは、粉砕した茶葉試料に内標準の$^{13}C_3$-アクリルアミドを添加後、水で抽出し、C18・陽陰イオン交換混合相固相抽出カートリッジによる精製後、臭素化し GC/MS で分析する。アクリルアミドを GC/MS で分析する際、ポリフェノール類がアクリルアミドの臭素化を妨げるため、除去しなければならない。ポリフェノール類の吸着剤として用いられているポリビニルポリピロリドンは、茶葉中の各アミノ酸及び糖類の分析過程において、その除去を目的として用いられる。しかし、ポリビニルポリピロリドンを用いてブランクテストを行ったところ、ポリビニルポリピロリドン由来の

ピークが臭素化されたアクリルアミドのピークと重なることがわかった（図2103-1)。従って、固相抽出カートリッジによるポリフェノール類の除去方法を検討することにした。固相抽出カートリッジに抽出液を通過させ、0.5mL ずつフラクションを分取し、

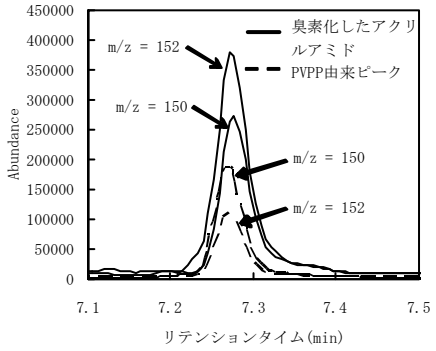


図2103-1　臭素化したアクリルアミドのピークとポリビニルポリピロリドン由来のピーク

(ｲ) 日本産各種茶に含まれるアクリルアミド含有量

焙じ茶のアクリルアミド含有量は250ppb から1880ppb（n=12）であったが、そのほとんどは400ppb から800ppb（n=10）であった。また、その浸出液はアクリルアミドを 5 ppb から41ppb 含有していた。煎茶のアクリルアミド含有量は30ppb から110ppb であり、その浸出液における含有量は 1 ppb から 2 ppb 含有であった。ウーロン茶はアクリルアミドを30ppb から90ppb 含有し、紅茶は20ppb 程度含有していた。ウーロン茶の浸出液は 1 ppb から 2 ppb のアクリルアミドを含有しているが、紅茶の浸出液からはアクリルアミドは検出されなかった。

(ｳ) 緑茶の焙煎条件がアクリルアミドの生成に及ぼす影響

100℃ の焙煎条件ではアクリルアミドは生成されないが、それより高い焙煎温度では生成した。アクリルアミドが最も多く検出された条件は、180℃ で10分の焙煎であった。160℃ を超えて焙煎すると、焙煎時間が長いほどアクリルアミドの生成量は少なく、また焙煎温度が高いほどアクリルアミドの生成量は少なかった（図2103-3)。

ポリフェノール含有量を分析した。その結果、５番目以降のフラクションにカテキン類が多く含まれるようになることがわかった（図2103-2)。従って、カテキン類をほとんど含まない２番目から４番目のフラクションを分取して分析に用いることにした。

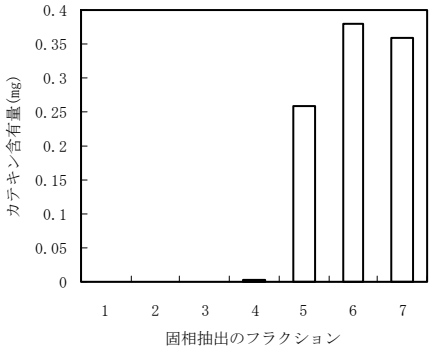


図2103-2　フラクションに含まれるカテキン含有量

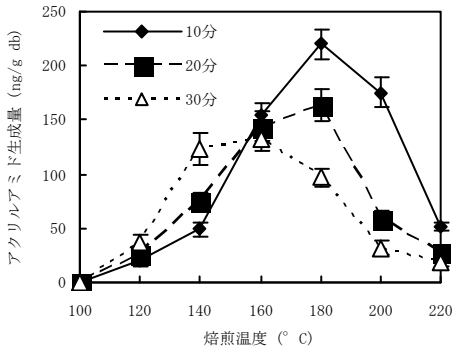


図2103-3　緑茶の焙煎条件がアクリルアミドの生成に及ぼす影響

(ｴ) 緑茶中の糖及びアミノ酸量が焙煎後のアクリルアミド生成量に及ぼす影響

原料茶葉からはアクリルアミドは検出されなかったが、焙煎後のアクリルアミド含有量は125ppb から575ppb であった。アクリルアミドの生成量に対する原料茶葉成分の影響度の大小を重回帰分析における分散比と P 値から判断したところ、アスパラギンの分散比が最も大きく178であり、また P<0.001であった（表2103-1)。次いでグルタミン酸、アスパラギン酸、テアニンの分散比が大きかったが、アスパラギンとテアニンは内部相関が認められた。そこで、それぞれの成分を還元糖と等モルの割合で混合し、焙

煎条件で加熱したところ、テアニンからはアクリルアミドはほとんど生成せず、茶葉中のテアニンはアクリルアミド生成にほとんど関与していないと判断された。このことから、緑茶中のアクリルアミドの生成にはアスパラギンが強く関与していると言える。

表2103-1　緑茶中の糖及びアミノ酸組成がアクリルアミドの生成に及ぼす影響

	分散比	*P*値
アスパラギン酸	6	<0.05
グルタミン酸	13	<0.01
アスパラギン	178	<0.001
セリン	1	n.s[1)]
グルタミン	1	n.s
アルギニン	<1	n.s
アラニン	4	n.s
テアニン	5	<0.05
スクロース	<1	n.s
グルコース	<1	n.s
フルクトース	3	n.s

1）有意差なし。

(オ) 摘採後の生葉管理が焙煎後のアクリルアミド生成量に及ぼす影響

摘採直後に製造後焙煎を行った場合、茶葉に含まれるアクリルアミドは200ppb であった。温度10℃下で24時間貯蔵すると、アスパラギンは約 8 倍に増加し還元糖は 4 割程度減少した（図2103-4)。焙煎後のアクリルアミド生成量は520ppb であり、摘採後ただちに製造後焙煎した時に比べ、約2.5倍に増加した（図2103-5)。また、温度25℃から30℃下で24時間貯蔵した場合、アスパラギンは約60倍に増加し還元糖は半減した（図2103-4)。なおこの時、焙煎後のアクリルアミド生成量は1180ppb であった（図2103-5)。

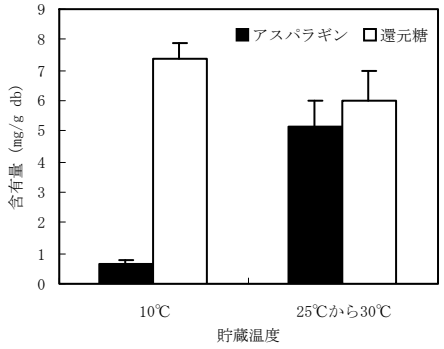


図2103-4　生葉貯蔵後のアスパラギンと還元糖含量

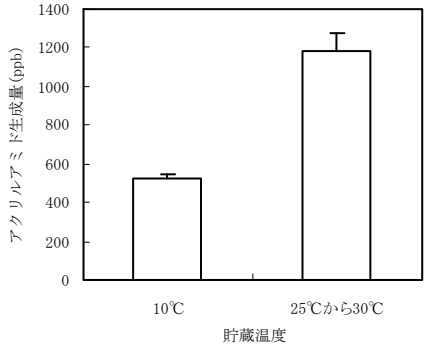


図2103-5　生葉の貯蔵温度と焙煎後のアクリルアミド生成量

エ　考　察

アクリルアミドは焙じ茶に多く含まれており、煎茶における含有量はその約 1 割程度であった。通常、煎茶は120℃から130℃付近、焙じ茶は180℃付近での焙煎過程を経て製造される。アクリルアミドが最も多く検出される焙煎条件は、180℃ で10分であるので、焙じ茶にアクリルアミドが多く含まれることが理解できる。

焙煎温度が高くなるほどアクリルアミド生成量は少なかった。アクリルアミドの沸点が175℃付近であ

ることを考慮すると、高い焙煎温度においてアクリルアミドの昇華が起こったことが考えられる。

焙煎前の茶葉のアスパラギン含量が焙煎後のアクリルアミド生成量を大きく左右することが明らかになった。バレイショでは、糖含量が揚げ加工後のアクリルアミドの生成量を左右することが知られている（Ohara-Takada ら2005b）。原料茶葉は糖含有量よりアスパラギン含有量が少ないが、バレイショではアスパラギン含有量の方が多い。食品に含まれるアクリルアミドがアスパラギンと糖から生成することを考えると、含量の少ない方がその生成量を左右すると言える。

生葉を貯蔵するとアスパラギンが増加し還元糖は減少するが、焙煎後のアクリルアミド生成量は多くなることが明らかになった。従って、アクリルアミドが生成しやすい条件での焙煎を行って製造される焙じ茶原料は、貯蔵せずに採後直ちに製造することが望ましい。

オ　今後の課題

茶類の中でも焙じ茶はアクリルアミド含有量が高い。今回、アクリルアミド低減化技術開発のために、その生成機構を解明した。本結果を踏まえると、茶に含まれるアクリルアミドの低減化のためには、アスパラギンが少ない原料茶葉を用いることと、製茶品質を落さずアクリルアミドの生成を抑えた焙煎方法を開発することが必要である。

カ　要　約

茶類に含まれるアクリルアミドの分析法を確立した。GC/MS を用いた分析過程において、ポリフェノール類は妨害要因となる。そこで、妨害成分を除去するため固相抽出カートリッジを用いた精製方法を改良した。茶に含まれるアクリルアミドは、原料茶葉を180℃ で10分焙煎したときに最高になり、焙煎後のアクリルアミド含有量は原料茶葉のアスパラギン含有量の影響を強く受けることがわかった。さらにアスパラギンは摘採後の生葉を貯蔵すると増加し、焙煎後のアクリルアミド生成量も多くなることがわかった。茶に含まれるアクリルアミドの低減化のためには、アスパラギンが少ない原料茶葉を用いることと、製茶品質を落さずアクリルアミドの生成を抑えた焙煎方法を開発することが必要である。

キ　引用文献

Friedman, M. 2003. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51：4504-4526.

FAO/WHO. 2005. Summary and conclusions from the 64th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Summary report of a meeting held in Rome. Feb 8 -17. WHO. Rome. Italy. 7 -17.

Ohara-Takada, A.・Matsuura-Endo, C.・Chuda, Y.・Ono H.・Yada, H.・Yoshida M・Kobayashi, A.・Tsuda, S.・Takigawa, S.・Noda, T.・Yamauchi, H.・Mori M. 2005. Change in content of sugars and free amino acids in potato tubers under short-term storage at low temperature and the effect on acrylamide level after frying. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 69：1232-1238.

研究担当者（水上裕造*、木幡勝則、山口優一、林宣之、澤井祐典）

4　スギヒラタケの致死性毒物質の解明

ア　研究目的

スギヒラタケ（写真2104-1）は、日本中に自生するキノコであり、長年にわたり広く食されてきた。しかし、平成16年10月に、スギヒラタケの摂取が、主に腎障害のある人に対する急性脳症の原因となっている可能性が指摘され、食の安全を脅かす新たな問題であることが明らかとなった。十分な食経験があるスギヒラタケが、突然、毒性を発現した理由は全く解明されておらず、キノコへの細菌やウイルス

写真2104-1　杉の朽木に群生するｽｷﾞﾋﾗﾀｹ

の感染、キノコの突然変異など、様々な可能性について検討が行われた。このようななかで、我々は、スギヒラタケの抽出成分中に、マウスへの腹腔内投与試験により致死活性を示す画分を見いだした。

本研究では、このキノコから致死性毒物質の単離を行うとともに、急性脳症との関連や作用機構を明らかにすることを目的とした。また、事件発生当初、レクチン原因説が報道されたため、レクチンを精製し、毒性を検討することも目的とした。

イ　研究方法

(ｱ) 入手したスギヒラタケを凍結乾燥後、破砕し、ヘキサン、酢酸エチル、エタノール、水、熱水で順次、抽出した。

(ｲ) 各抽出画分を、マウスの腹腔内、あるいは静脈内に投与し、毒性の有無を確認した。

(ｳ) 活性画分の熱安定性、pH 安定性などを検討した。

(ｴ) 致死活性と他の活性（目の充血や痙攣）を指標に、各種クロマトグラフィーを駆使して毒本体の単離を試みた。

(ｵ) 種々のクロマトグラフィーを駆使してレクチンを単離・精製し、毒性を検討した。

ウ　研究結果

スギヒラタケを含水アルコール次いでアセトンで抽出し、抽出液を合わせ減圧濃縮後、分液ロートでヘキサン相（画分１）と水相に分けた（図2104-1)。水相はさらに酢酸エチル可溶部（画分２）と水可溶部（画分３）に分けた。これらの３つの画分をマウスの腹腔内に注射器で注入したが、何の変化も観察されなかった。そこで、水で抽出を行い、水可溶部（画分４）と残渣に分け、残渣はさらに熱水で抽出し、熱水可溶部（画分５）を得た（図2104-2)。これら２つの画分をマウスに与えたところ、両画分ともマウスが死んだ。次に、両画分（４，５）をセルロースチューブで透析を行い、低分子画分（画分６，８）と高分子画分（画分７，９）がそれぞれ得られた（図2104-2)。致死活性はどちらも高分子画分（画分７，９）に現れた。画分４は水に溶解し100℃で30分処理しても致死活性は失わなかった。以上のことから、マウスに対する致死性毒は、熱に強い水溶性高分子であることが判明した。現在、致死活性を指標に、各種クロマトグラフィーを駆使して毒物質の単離を試みている。当初は、マウス体重 kg 当たり数ｇ与えて初めて致死活性が現れたが、現在最も精製が進んでいる画分は約25mg/kg（マウス１匹当たり１ mg 以下）で致死活性を示している（河岸洋和 2005a, b, 2006)。

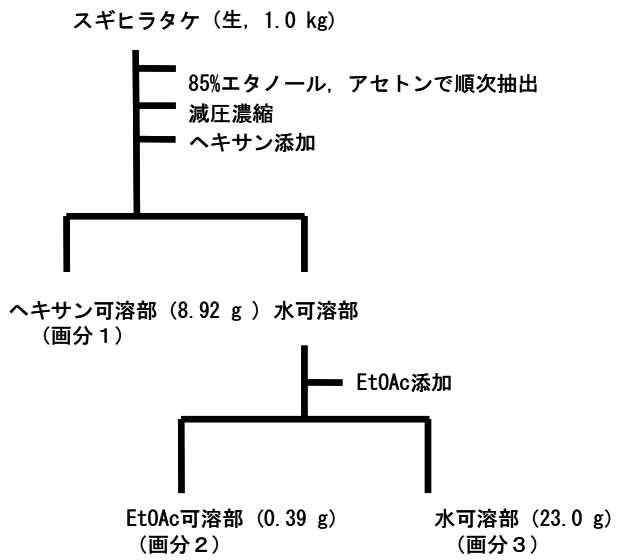


図2104-1　スギヒラタケ抽出物の分離方法１

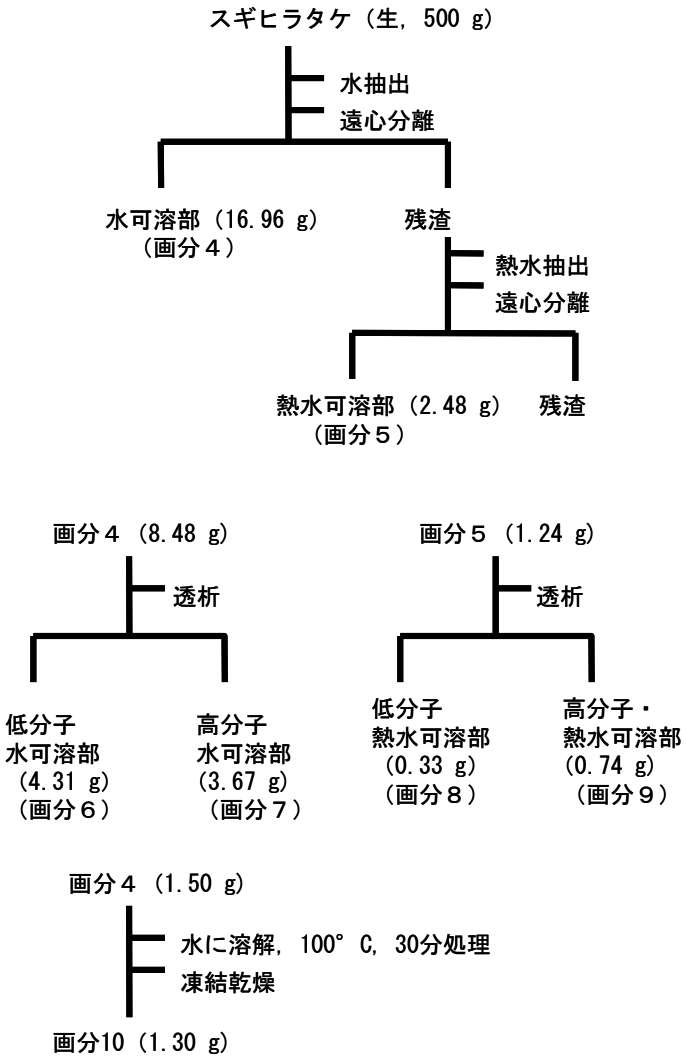
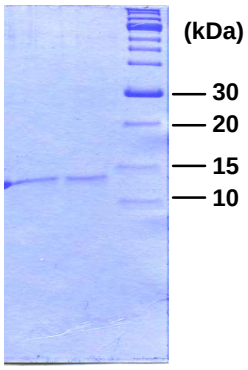


図2104-2　スギヒラタケ抽出物の分離方法2



M：分子量マーカー
１：非還元時
２：還元時

図2104-3　ｽｷﾞﾋﾗﾀｹﾚｸﾁﾝの SDS-PAGE

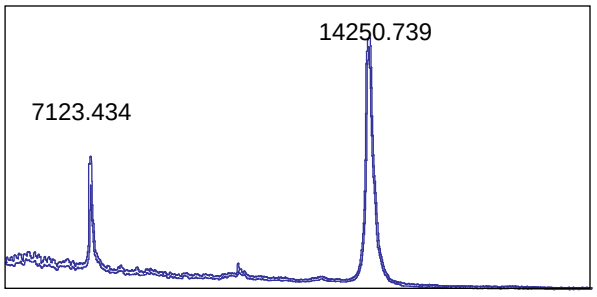


図2104-4　ｽｷﾞﾋﾗﾀｹﾚｸﾁﾝの MALDI-TOF-MS

表2104-1　各種糖類によるスギヒラタケレクチンの赤血球凝集阻害試験

阻害糖*	最小阻害濃度**
N-Acetylgalactosamine	0.39 (mM)
Lactose	12.5
Lacturose	12.5
Galactose	25
Methyl β−galactoside	25
Methyl α−galactoside	50
Lactitol	50
Fucose	50
2-Deoxygalactose	100
AsialoBSM	0.49 (μg/ml)
PSM***	1.95
BSM****	3.9

*Glucose, mannose, L-fucose, arabinose, L-arabinose, ribose, glucosamine, galactosamine, mannosamine, raffinose, *N*-acetylglucosamine, *N*-acetylmannosamine, *N*-acetylneuraminic acid, *N*-glycolylneuraminic acid, *N*-acetylneuraminlactose, methyl α−glucoside, methyl β-glucoside, methyl β-mannoside, melibiose, chitobiose, chitotriose, chitotetraose, chitopentaose, xylose, galacturonic acid, glucono-1,5-lactone, saccharose, rhamnose, ribulose, gluctosamine hydrochloride, galactosamine hydrochloride, mannosamine hydrochloride, methyl α−*N*-acetylglucosamine, methyl β-*N*-acetylglucosamine, 2-deoxyribose, 2-deoxyglucose, N-acetylchitotriose, phenyl α−*N*-acetylglucosamine and phenyl β-*N*-acetylglucosamine did not inhibit at all at concentrations up 400 mM. Lactbionic acid, mannnan, albumin (bovine), albumin (chicken egg), transferrin (human), α_1-acid glycoprotein (human), fetuin and asialo-fetuin did not inhibit at all at concentrations up to 1 mg/ml.
**These are minimum inhibitory concentrations required for inhibition 4 hemagglutination doses of the lectin.
***PSM; porcine stomach mucin.
****BSM; bovine submaxillary gland mucin.

また、スギヒラタケを PBS で抽出し、抽出液を酸処理セファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって、レクチンを精製した。精製したレクチンは SDS-PAGE において、14kDa 付近に還元、非還元に関わらず単一バンドを示し（図2104-3)、MALDI-TOF-MS においても m/z 14250を示した（図2104-4)。ゲル濾過による分子量推定では58,000を示したことから、このレクチンは S-S 結合を有さない同一サブユニットの 4 量体であることが明らかになった。このレクチンは N-アセチルガラクトサミンに極めて強い結合特異性を示した（表2104-1)。マウスへの毒性を検討したところ、腹腔内投与では150mg/kg、静脈内投与では15mg/kg でも毒性を示さなかった。

エ　考　察

レクチンの毒本体説は否定された。我々が単離を試みている物質がヒトの急性脳症の発症に関わっているか否かは現在の所、不明である。実際に急性脳症で亡くなった患者の脳では、神経細胞の突起（軸索）を取り囲む髄鞘が随所で破壊されており、「脱髄病変」を呈していたことを、東京都神経総合研究所の新井信隆博士が明らかにしている。我々の抽出物でマウスに「脱髄病変」が起きるか否か、新井博士と共同で検討中である。

スギヒラタケが突然毒化したのか、あるいは元々毒をもっていたが中毒が多発していなかったため知られていなかったのかは、現時点では不明である。

我々の研究が成功し、毒物質の構造や活性発現機構が明らかになれば、このキノコ摂取による急性脳症の治療法の確立に寄与できるであろうし、また、何故、このキノコが毒を作るのかという疑問の解決の糸口を与えるであろう。

オ　今後の課題

毒本体を完全に精製し、構造、作用機構を明らかにする。

カ　要　約

2004年秋、野生の食用キノコであるスギヒラタケを食することによって55名の方が急性脳症となり、

17名が亡くなった。我々はこのキノコの水抽出物がマウスに対して致死性の毒性を示すことを初めて確認した。現在、毒本体の単離を試みている。レクチンを精製したが毒性は示さなかった。

キ　引用文献

河岸洋和 2005a.　不思議な生物現象の化学　－生物現象鍵物質－. 上村大輔（編）. クバプロ. 104-114.
河岸洋和 2005b.　きのこの生理活性と機能. 河岸洋和（編）. シーエムシー出版. 26-31.
河岸洋和 2006.　キノコの安全性：スギヒラタケ中毒. ILSI. 85：53-56.

研究担当者（河岸洋和*）

5　食品の安全性に係わるリスクコミュニケーションに関する意識調査と問題点の特定

ア　研究目的

わが国では2003年からリスクアナリシスに基づく食品安全行政を行うこととなった。その過程で政府は、消費者をはじめとする利害関係者との情報・意見の交換や、その情報・意見の政策への反映のため、リスクアナリシスの一要素であるリスクコミュニケーションを行う。わが国で最近起きた食品安全に係わる事件においては、リスクコミュニケーションの失敗により、消費者の政府や生産者・製造者に対する信頼の低下や、販売量の減少が見られた。従って、より良い結果につながるリスクコミュニケーションを行うことが重要であり、そのための情報の収集や手法の開発を目的として研究を行った。

イ　研究方法

食品の安全性に対する市民のリスク認知を多次元的に捉えるために、段階的に質問紙調査を行った。

2001年に2000名に対して行った質問紙調査の統計解析を行い、それに基づき、2002年（2000名）及び2003年（3000名）秋に、無作為抽出した20歳以上80歳未満の首都圏市民を対象として、郵送法により質問紙調査を実施した。その結果を、社会心理学・社会調査法で用いられる統計的手法により分析した。統計学的解析にはSPSSを使用した。前年の調査の結果を踏まえ、毎年、前年度より踏み込んだ内容の調査を行った。

さらに、2003年秋の調査結果に基づき、その調査時に募った自主的な調査協力者252名を対象に、平成2004年秋、内容的に踏み込んだ調査を実施した。その結果の解析には、因子分析に基づき、数量化されたリスク概念に基づいてリスクを認知する専門家とは異なった一般の人々のリスク認知の構造を多次元的に捉えることに優れており、リスク認知研究で主流となっているSlovicのサイコメトリック・アプローチ(Slovic, 1987, 1992, Slovicら, 1980)を活用した。

ウ　研究結果

(ｱ) 回収率

質問紙による郵送法により3度実施したが、2001年のわが国におけるBSE感染牛検出第一例直後には39.4％と、郵送法にしては高い有効回収率を得たが、その後2002年の調査では34.4％、2003年の調査では29.5％と有効回答は減少傾向を示した。

(ｲ) 調査結果

2001年に行った「市民の食に対する意識と食品購買行動」調査の結果は、食に対する市民の意識は一様ではないことを示すとともに、これまで食に対する意識は女性、特に小さな子供を抱える主婦が高く、男性はあまり関心がないという固定概念は正しくないことを示した。女性において、特に50歳未満の層では食に対して無頓着な者は30％余り存在していたし、また、男性においても、決して食に対して無頓着なのではなく、40歳以降には健康志向の者も40％余り存在し、自分で調理をする者も増えていた。また、小さな子供がいる女性が、特に食に対して関心が高いというわけでもなかった。こうした調査の回答者は、食に対する関心の高い層への偏りがあることは否めないが、それでも、本調査は、ステレオタイプ的な見方では市民の食に対する意識を正しく捉えることはできないことを示唆しているように思われる。なお、食品の安全性への関心は、購買行動とほぼ結びついていた。また、健康志向群といえども、調理済みの食品の利用は少なくなかった。

2002年の「食品の安全性に関する市民の関心及び行動」調査の解析結果は、以下のごとくである。

①　程度の差はあれ、94％が食品の安全性に対する関心を持っており、具体的には、60％以上が「食品添加物」「残留農薬」「BSE」「食品表示」について関心を持っていた。

②　年代については関心の程度に差があり、20代が特に低く、年代が上がるに従って関心は高くなった。具体的には「カビ毒」「残留農薬」「放射線照射

食品」「遺伝子組換え食品」「病原性細菌」への関心について、年代による差が見られた。

③　食品一般の安全性に対する関心の程度によって具体的項目への関心の持ち方が異なり、それによって安全性に関する項目を5つのタイプに分類できた。

④　BSE 問題発生から1年余りの牛肉の摂食行動に関する設問では、問題発生前と後で摂食行動に変化があったのは74%、2002年11月時点で牛肉の摂食が事件発生前の状態に回復していないのは33%であった。摂食行動が変化した時期は事件発生直後が66%、そのきっかけとして最も多かったのは「マスコミでの騒ぎが大きくなったから」で79%であった。摂食を再開した時期は、全頭検査の直後は13%に過ぎず、87%はしばらくしてからであり、そのきっかけは「全頭検査によって安全性が保証されたから」27%、「不安もあるが心配していても仕方がない」（37%）、「なんとなくそろそろ安心なような気がしてきた」（26%）など漠然としたものであった。

表2105-1　バリマックス回転後の因子負荷量

	因子Ⅰ	因子Ⅱ	因子Ⅲ	共通性
次世代への影響	**.745**	.237	.038	.615
今後の重要性	**.722**	.107	-.072	.565
社会責任/個人責任	**.669**	.197	-.272	.578
回答者の心配	**.653**	.557	.117	.751
個人被害回避コスト	**.560**	-.030	-.230	.460
人工的／自然発生	**.554**	-.315	.097	.440
社会全体への利益	-.153	**-.733**	.123	.639
結果の即時性	-.064	**.689**	.191	.527
消費者への利益	-.288	**-.682**	.150	.647
少量で顕現する被害	.500	**.613**	.139	.662
身体への影響	.604	**.607**	.083	.740
健康被害の可能性	.593	**.600**	.083	.729
摂取の自覚性	-.394	**-.509**	.437	.610
摂取者の規模	.195	**-.490**	-.082	.638
自己制御可能性	-.319	-.050	**.662**	.638
回答者の知識	.278	.041	**.630**	.490
科学的な判明	.030	.151	**.517**	.577
ハザードへの認知	-.375	-.460	**.481**	.586
説明分散	6.215	1.943	1.628	9.786
寄与率(%)	34.5	10.8	9.04	

2003年のより踏み込んだ調査の結果から、回答者を食品一般の安全性に対する関心および懸念の程度（それぞれの高低）によって4つのタイプに分類した。また、ハザードまたは食品についての14種類の特性（健康に害があると思うか、その害は深刻なものであると思うか、など）について「はい」、「いいえ」を選択する設問の回答を多次元スケーリングで解析し、リスク認知マップを作成した。各タイプのうち、低関心/低懸念タイプのみ、GMO（他より健康に関する懸念が低い）と食品添加物（他よりなじみが深い）について他の3タイプと違う認知を示した。この認知マップは、1994年（Sparks & Shepard)および1996年（Fife-Shaw & Rowe)に英国で作成されたものに類似していた。

2004年秋に行った自主的協力者を対象とする調査では、食品関連の「ハザード」として設定した消費者の関心が高い15項目について、先行研究を参考に設定した18のリスク特性を7点尺度で尋ね、その結果を主成分分析し、3因子を抽出した（累積説明率54.4%）。バリマックス回転後の因子負荷量は表2105-1に示した通りであるが、因子Ⅰを「将来への社会的不安」、因子Ⅱを「即時的に顕現する健康被害」、

因子Ⅲを「既知性／未知性」とした。第Ⅰ因子を X 軸、第Ⅱ因子を Y 軸とした平面上に各「ハザード」を布置したものが図2105-1、第Ⅲ因子を Y 軸に、第Ⅰ因子または第Ⅱ因子を X 軸に設定した平面上に各「ハザード」を布置したものが図2105-2と図2105-3である。本研究では、これまでのリスク認知研究で明らかにされてきた一般の人々のリスク認知を構成する「被害の甚大さ」と「未知性」の次元とは別に、「将来への社会的不安」の次元を抽出した。この「将来の社会的不安」の高い「ハザード」については、今後、リスクコミュニケーションによって社会的議論を深めていく必要がある。

エ　考察

安全性に対する関心には性差はないが、年代による差はあり、関心の低い20代については啓蒙の必要性が示唆されること、及び具体的な項目への関心については食品一般の関心の高さにより違いがあり、それに応じたコミュニケーションのあり方を考える必要があることなどを示した。

この研究によって作成されたリスク認知マップは、市民の食品「ハザード」に対する認知が極めて似通っていることを示すとともに、1994年と1996年に英国で作成された認知マップに類似していた。

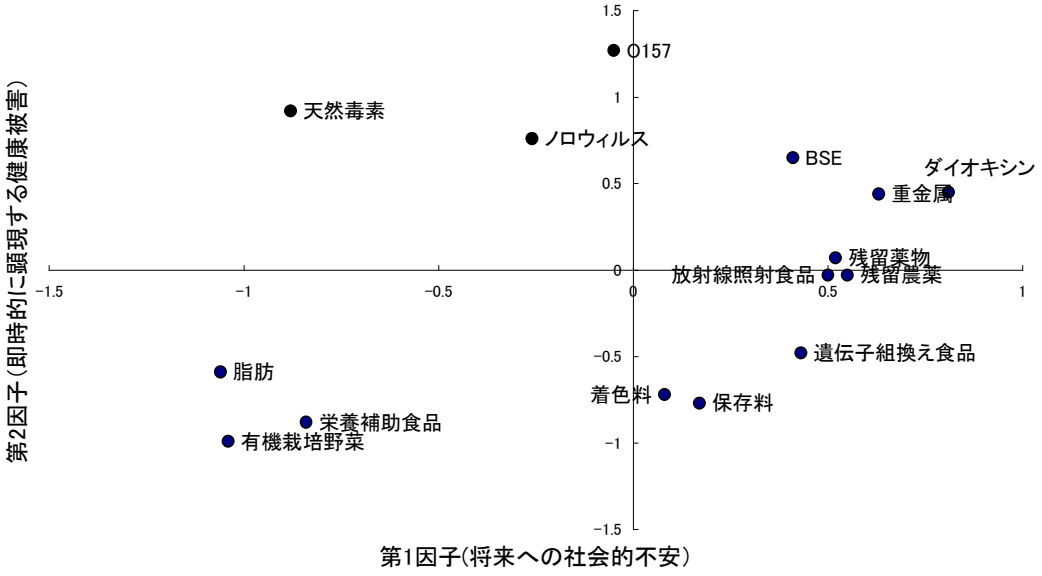


図2105-1 第 1 因子と第 2 因子によるリスク認知

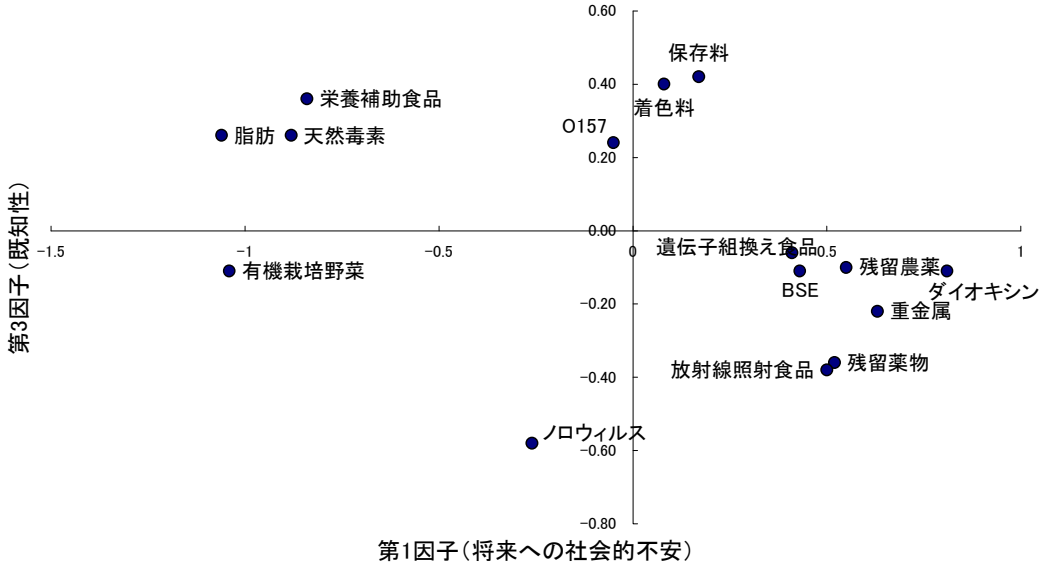


図2105-2 第 1 因子と第 3 因子によるリスク認知

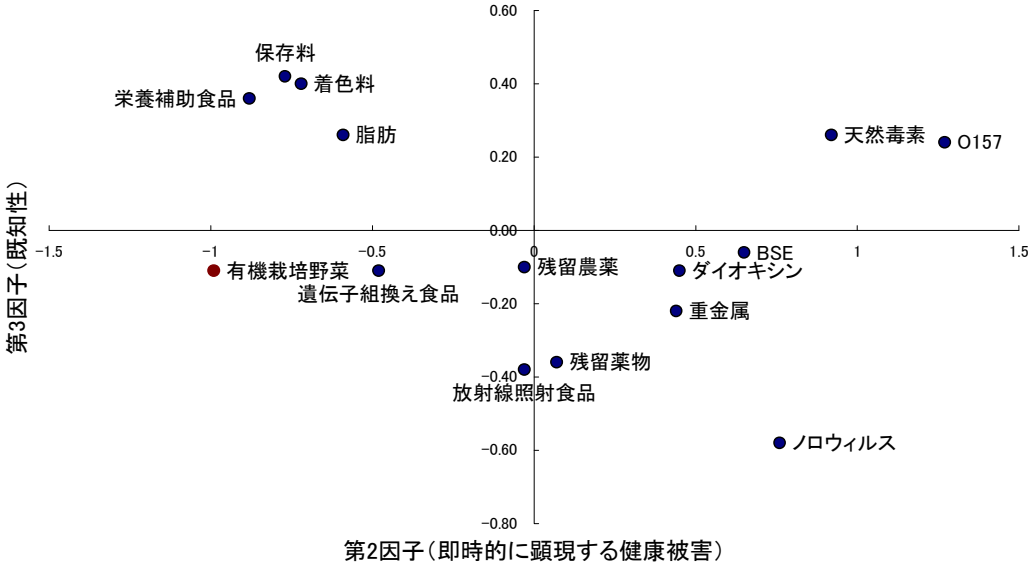


図2105-3 第２因子と第３因子によるリスク認知

この結果から、食や食品に対する関心や懸念が比較的高いと思われる調査協力者対象の調査でも、社会のマジョリティの意識を反映しているとみなすことが必ずしも妥当性を持たないわけではないことが示唆された。

オ　今後の課題

有効なリスクコミュニケーションの計画実施に資するためには、食品事業者等、消費者以外の重要な食品安全に関わる利害関係者に対する意識調査が必要である。

カ　要約

(1) 2003年度には、第１ステップとして、「ハザード」について「リスク特性」について回答を求め、その結果を人々の食品に対する関心および懸念のレベル別に多次元尺度法によって平面上に布置した。その結果、食への関心が低く、かつ、食品の安全性に対する関心も低い群を除き、市民の食品「ハザード」に対する認知は、極めて似通っていることが判明した。

(2) この結果から、食や食品に対する関心や懸念が比較的高いと思われる調査協力者対象の調査でも、社会のマジョリティの意識を反映しているとみなすことが必ずしも妥当性を持たないわけではないことが示唆された。

キ　引用文献

Fife-Schaw, C. and Rowe, G. (1996) Public Perceptions of Everyday Food Hazards: A Psychometric Study, Risk Analysis, 16(4), 487-500.

Slovic, P. (1987) Perception of Risk, Science, 236, 280-285.

Slovic, P. (1992) Perception of Risk: Reflections on the Psychometric Paradigm, In Krimsky, S. and Golding, D. (eds) Social Theories of Risk, Wesport: Praeger, pp. 117-152.

Slovic, P., Fischhoff, B. and Lichtenstein, S. (1980) Facts and Fears: Understanding Perceived Risk, In Schwing, R. C. and Albers, Jr. W. A. (eds) Societal Risk Assessment: How safe is Safe Enough? New York: Plenum, pp. 181-216.

Sparks, P. and Shepherd, R. (1994) Public Perceptions of the Potential Hazards Associated with Food Production and Food Consumption: A Empirical Study, Risk Analysis, 14(5), 799-806.

研究担当者（林　徹*）

第２章　食品衛生管理における有害微生物の増殖予測・検出技術の開発

１　温度管理用微生物センサーの性能評価と応用

ア　研究目的

食品の微生物学的安全性確保には、低温管理は有効な手法であるが、温度管理の失敗は食中毒事故等の要因となる。特に近年、食品に対する栄養性・機能性・新鮮さ・利便性などを追求する傾向から、加熱殺菌が適用出来ない生鮮・最小加工食品の消費が伸びている。また、低温で増殖可能なリステリア等の病原微生物による食中毒事例が欧米先進国で最近増加しており、我が国でも「農場から食卓まで」の温度管理の厳密さが求められてきている。そのために食品由来の素材や微生物を材料として、微生物の増殖とともに発色や発泡する安全・簡便・安価な微生物温度センサーを開発し、実験室レベルと現場試用による性能評価を行って微生物センサーを信頼性高く実用に供することが出来るよう進化させることを目的とする。

イ　研究方法

(ｱ) 透明な気密性の合成樹脂フィルムを用いて各種の食品成分や食品由来の色素と食品微生物を封入し温度変化に伴うガス発生状況や色調変化を観察し、ガス発生や色調変化の目視を特徴とする温度管理用微生物センサー開発の可能性を追求した。

(ｲ) ガス発生目視型微生物センサーの性能評価と自動作成機・貼り付け装置の開発を行った。

(ｳ) 実際の低温流通食品（惣菜・加工生肉等）の温度管理用微生物センサーの設計を検討した。

(ｴ) 大手青果会社の協力を得て、生鮮農産物の生産現場から消費に至る低温流通過程での温度管理に関する微生物センサーの有効性に関する大規模実証試験を行った。

ウ　研究結果

(ｱ) 安全な食品成分と食品微生物（パン酵母）を用いてガス発生を指標とする温度管理用微生物センサーを開発した(図2201-1)。

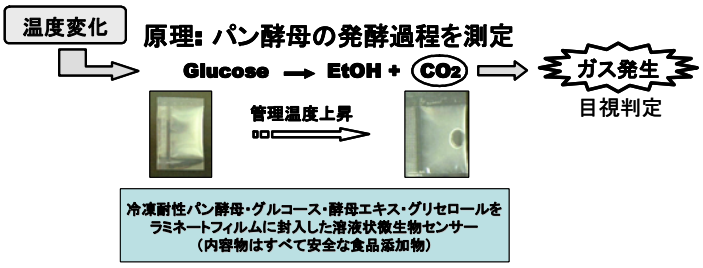


図2201-1　パン酵母を用いた温度管理用微生物センサーの原理

(ｲ) 冷凍耐性パン酵母を活用した溶液封入タイプのガス発生型センサーは、対象食品の危害発生推定時間に合わせたガス発生速度の調節が可能であることが明らかとなった(図2201-2)。またセンサーは、一週間安定に凍結保存可能であった。さらにセンサーが置かれていた環境の温度変化履歴を推定可能であることが明らかとなった(図2201-3)。

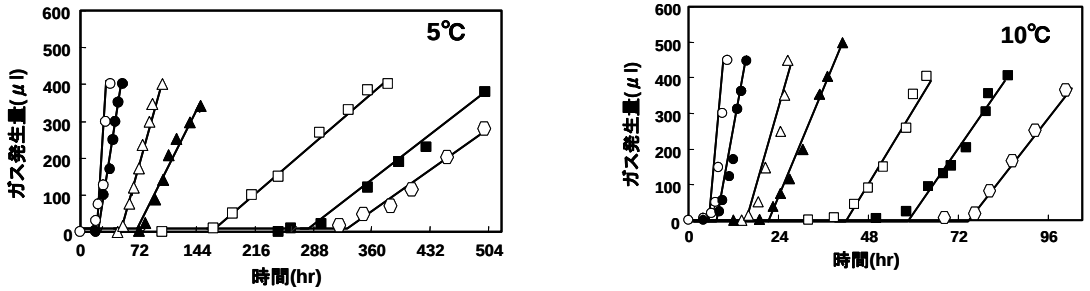


図2201-2　低温下でのセンサーのガス発生能に及ぼすパン酵母添加濃度の影響

パン酵母の添加濃度が0.2mg/ml(〇)，0.5mg/ml(■)，1mg/ml（□），2.5mg/ml(▲)，5mg/ml（△),10mg/ml（●）および15mg/ml(◯)のセンサーの各低温度におけるガス発生能を測定した。センサーのグルコース添加濃度は1%に固定した。

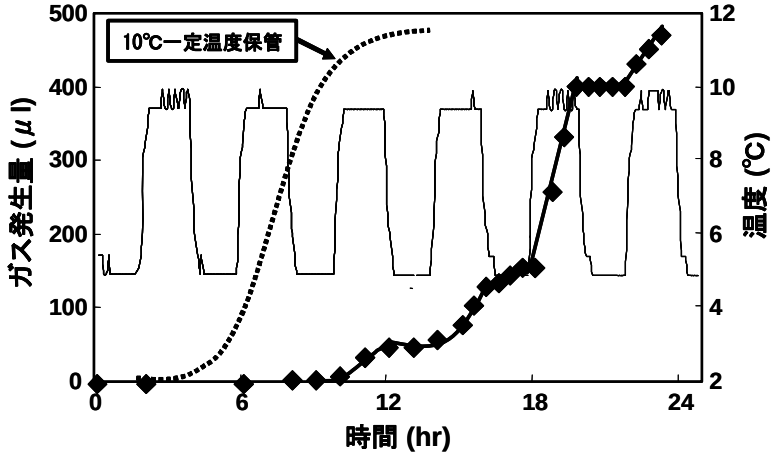


図2201-3　2時間ごとの5℃と10℃間の温度変化を負荷した場合の微生物センサーのガス発生経時変化

パン酵母及びグルコース添加濃度がそれぞれ10mg/ml および1%の微生物センサーに温度変化を負荷した場合のガス発生の経時変化を実線（◆）でまた10℃の一定温度保管した場合を破線で示した。実際の温度変化（細線）は、自動温度記録計により連続的にモニタリングした。

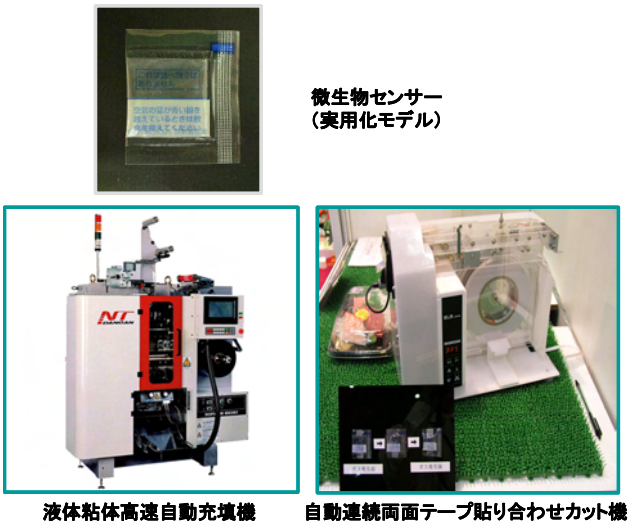


図2201-4　微生物センサーの大量生産システム

表2201-1　葉菜類集配・輸送・保管過程での センサーのｶﾞｽ発生量変化

	経過時間(h)	センサー3(μl)	センサー4(μl)	センサー5(μl)
A農場積込み完了	0	0	0	0
B農場積込み完了	1	0	0	0
C農場積込み完了	1.5	0	0	30
本場到着	5	0	微量	250
保管･ﾋﾟｯｷﾝｸﾞｾﾝﾀｰ	6	0	微量	ー
低温庫出し	22	微量	10	ー
ﾋﾟｯｷﾝｸﾞ完了	29	35	60	ー
低温庫出し	43	ー	ー	ー
ﾋﾟｯｷﾝｸﾞ完了	48	100	175	ー
低温庫出し	94.5	200	300	ー
ﾋﾟｯｷﾝｸﾞ完了	99	300	450	ー

センサー3，センサー4及びセンサー5はそれぞれ10℃で35時間，27時間及び8時間でｶﾞｽ発生を開始するように設計

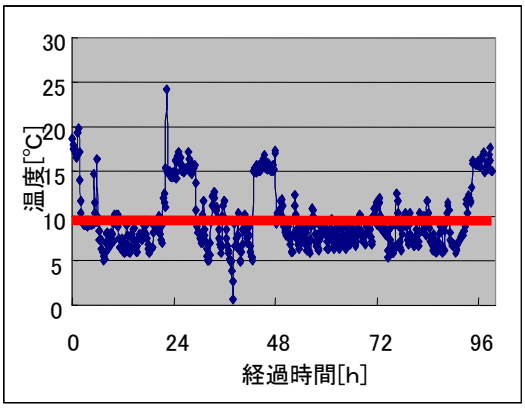


図2201-5　葉菜類集配・輸送・保管過程での管理温度変化

(ｳ) ガス発生型微生物センサーを自動作製機（生産能力：1時間当たり24,000センサー連包）およびカットして対象商品に貼り付けることができるカット・貼り付け機を試作できた(図2201-4)。

(ｴ) 低温流通食品（惣菜・加工生肉等）の輸送段階・消費期限までの温度管理に利用可能なセンサーの設計ができることを明らかにした。

(ｵ) 果菜類の実証試験（輸送には箱車を使用）で

は、規定管理温度15℃よりも低い温度が試験工程中保たれており、微生物センサーのガス発生は認められなかった。一方、葉菜類の実証試験（輸送にはウィング車を使用）では、運行開始の積込み時や低温庫出しからピッキング完了までの間で規定管理温度を超える温度上昇があったため、微生物センサーのガス発生が早くなった(表2201-1、図2201-5)。

エ　考　察

(ｱ) バイオセンサーに着目し、安全な食品微生物の乳酸菌或いはパン酵母の発酵能自体の利用を考えた。すなわち乳酸発酵の酸生成による天然色素のpH依存的な色調変化或いは糖の発酵による二酸化炭素（気体）発生により一目で簡便に温度管理不備を検知できる微生物センサーの作成が可能ではないかとの発想から検討を行った。①長年の食経験によるパン酵母の安全性②パン酵母の発酵活性は、温度低下と共に減少するが0℃付近まで維持③高品質のパン酵母細胞が生イーストとして安価に業務用販売等の理由から、最終的にパン酵母を用いた温度管理用微生物センサーの実用化に向けた開発研究に集中することとした。

(ｲ) 低温においてセンサーのガス発生誘導時間とガス発生速度をパン酵母添加濃度の調整によりコントロールできることが明らかとなった。すなわち、個々の食品の低温流通温度と賞味期限や輸送時間に適した温度管理用のセンサーの作成ができることが示唆された。また食品が温度不備に置かれた時間をセンサーのガス発生量で推定可能であることが示唆された。以上の結果から、低温管理が必要な生鮮或いは最小加工食品などの非加熱食品に関して、それぞれの品目の流通・保管温度の適したオーダーメードの微生物センサーの作製が可能であると考えられた。

(ｳ) 自動化大量生産システムの開発により、微生物センサーのコストは1個あたり数円程度と極めて安価になることが試算された。

(ｴ) 実際の流通現場での個々の食品の賞味期限や輸送時間の温度管理に適したセンサーの設計が可能であることまた生鮮食品の低温流通での実証試験でセンサーは温度異常を検知できたことから、開発した微生物センサーは実用化に耐え得るものと考えられた。

オ　今後の課題

すでに実用化可能な段階であるが、今後は実証試験を重ねて改良点を洗い出すと共に大量生産システムの改善によるコストの低下に努める必要がある。

カ　要　約

温度管理用の微生物センサーを開発した。酵母がパンを膨らます原理すなわち酵母が糖を発酵して炭酸ガスを放出するが、その発酵は温度が高くなるほど活発になることを利用している。センサー自体は、パン酵母や糖（ブドウ糖）などからなる溶液をフィルムに密封した単純なものである。食品によって、低温流通の温度域は異なるが、パン酵母と糖の量を調整すれば、品目毎に温度や流通時間の設定を変えて、オリジナルのセンサーを作れる。温度管理が不備なほど、炭酸ガスが増えて袋がふくらみ誰にでも肉眼で異常が確認できる。その内容物は、ほかに発酵を促す酵母エキスなど、すべて食品に使える安全なものである。またセンサーは、使用まで作製後1週間は安定に凍結保存できる。大量生産できる機械も整え、1個数円と低コスト生産が可能である。

キ　引用文献

川本伸一2004. 微生物を用いた評価技術の開発，農林水産文献解題　No.30 食品の体機
能調節に関する研究，農林水産省農林水産技術会議事務局編，財団法人農林統計協会，21-28.

2) Kawamoto, S., Kawasaki, S., Bari, M. L., Inatsu, Y., Kogure, H., Kawasaki, S., Nakajima, K., Sakai, N., and Futase, K. 2004. Development of a novel microbial sensor for monitoring temperature changes of food. 2004 Proceedings p39-47 (2004), 33nd UJNR Food and AgriculturePanel Meeting, Hawaii, USA.

3) Kogure, H., Kawasaki, S., Nakajima, K., Sakai, N., Futase, K., Inatsu, Y., Bari, M. L., Isshiki, K., and Kawamoto, S. 2005. Development of a novel sensor with baker's yeast cells for monitoring temperature control during cold food chain. J. Food. Prot., 68 (No.1):182-186.

4) 川本伸一 2005. 食品の温度管理不備を検知する微生物センサーの開発，食品工業, 48(No.10):40-48.

研究担当者（川本伸一*、稲津康弘、Md. Latiful Bari、川崎晋）

2　ストレスで生存している食中毒細菌の検出方法に関する研究

ア　研究目的

食品の安全性を確保するためには、食品を汚染する病原微生物を健康危害が起こらないレベルに抑える必要があり、それには、食品の製造加工及び食品原料の生産収穫過程における病原微生物の消長に関するデータの集積が必要となる。こうした微生物の消長については、従来より行なわれている実験室内での接種実験のみならず、実際の食品の製造加工や食品原料の生産収穫における接種実験によって、より現実に近い条件での微生物の消長の知見を得ることが望まれる。しかし病原微生物そのものを用いてこうした野外実験を行なうことはバイオハザードの観点から不可能であるため、その代替微生物として、病原微生物と同等の性質を持ち、かつ、病原性を欠いている微生物を指標菌として用いざるを得ない。本研究の目的は、とくに我が国に於いて高頻度に発生する食中毒細菌である腸炎ビブリオに着目し、野外での接種実験を可能とする非病原性の指標菌を見出し、これを用いた試験系を開発することにある。

イ　研究方法

(ア) 腸炎ビブリオ指標菌の選択

長期保存腸炎ビブリオ338株について、TCBS と CHROMAgar ビブリオ各寒天培地上のコロニー形態、PCR による *toxR* 遺伝子の有無、糖分解性を調べ、CHROMAgar ビブリオ寒天培地上で通常と異なる形状を示す菌を指標菌候補として選択した。

(イ) 増殖性、耐酸性、耐熱性、薬剤耐性

増殖性は、pH7.4の食塩加 TSB または塩酸を用いて pH を5.8および 6.2に調整した TSB 中における37℃での菌数の変化を、耐酸性は、クエン酸または酢酸で pH4.5に調整した緩衝食塩水中での菌数変化を、耐熱性は、50、55、60または65℃の温水で菌液を60秒間加温した後の菌数変化を、薬剤耐性は、ベンザルコニウム等の抗菌薬剤への菌の暴露による菌数変化を、それぞれ TCBS 寒天培地上でのコロニー数を計測することによって明らかにした。

(ウ) 魚介類流通モデル菌接種実験

魚介類としてアジを用い、アジに指標菌を接種し、陸揚げから販売までの過程を想定した条件における菌数変化を(イ)の方法を用いて調べた。

(エ) 加熱変性糖の腸炎ビブリオ挙動に及ぼす影響

糖の加熱処理物に腸炎ビブリオを暴露した後の菌数変化を(イ)の方法を用いて調べた。

ウ　研究結果

(ア) 腸炎ビブリオ指標菌の選択

長期保存後に、TCBS 培地上では通常の腸炎ビブリオ同様に緑色を示すが、酵素基質培地であるクロモアガー上で異なる色を呈するコロニーが出現することが認められた。これらのコロニーから、白色を呈し *toxR* 遺伝子をもたない菌を指標菌候補株とした。

(イ) 増殖性、耐酸性、耐熱性、薬剤耐性

３％食塩加緩衝水（pH7.4、6.2、5.8）中における増殖性(図2202-1)、酸耐性(クエン酸、酢酸、pH4.5)、薬剤耐性（次亜塩素酸など）（表2202-1）について、候補変異株（白色）と対象株（ピンク）の間に顕著な差異は認められなかった。50-60℃の加熱に対する耐性にも両株間の差異が認められなかったが、65℃においては一変異株が比較的大きな耐性を示した（表2202-2，表2202-3)。以上、クロモアガー上で白色を示す変異株の多くは通常の腸炎ビブリオの性質を備えていることが判明した。

表2202-1　保存株のコロニー形態

クロモアガービブリオ上の菌の形態（色）	菌株数
２色以上に分かれる	134
ピンク（一般的腸炎ビブリオ株）	163
薄ピンク	15
白	13
ピンク（まわり白）	6
白（まわり黒）	2
水色	0
白（中心黒ピンク）	3
白（中心ピンク）	2
合計株数	338

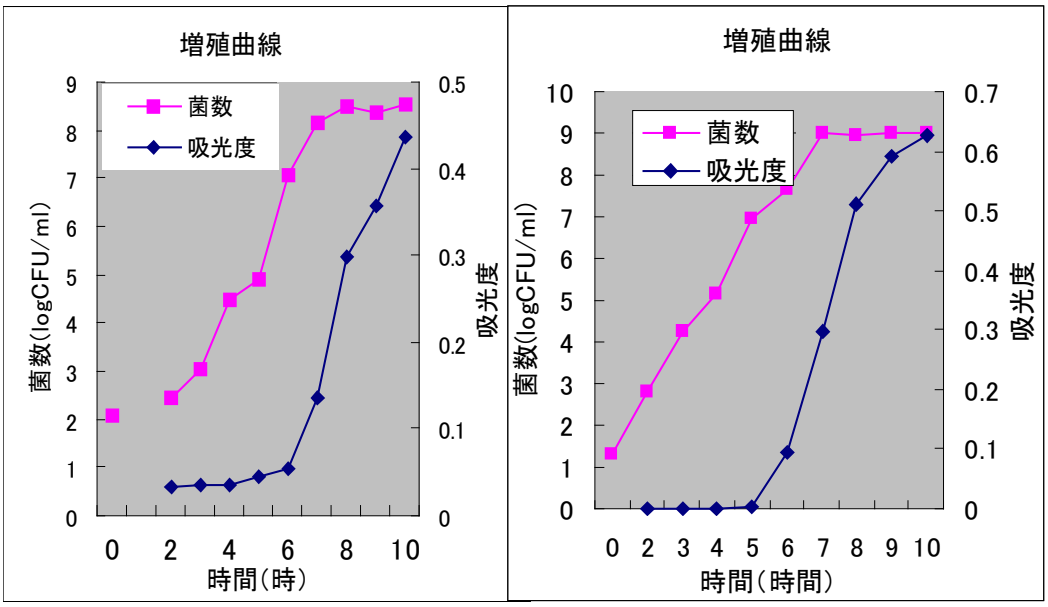


図2202-1　菌株58の増殖（左、ピンク：右、白）

表2202-2　薬剤耐性

菌株	最小発育阻止濃度（MIC）（ｐｐｍ）			最小殺菌濃度（MBC)（ｐｐｍ）		
	塩化ベンザルコニウム	グルコン酸クロルヘキシジン	次亜塩素酸ナトリウム	塩化ベンザルコニウム	グルコン酸クロルヘキシジン	次亜塩素酸ナトリウム
５８ピンク	12.5	25	125	12.5	25	125
５８白	12.5	12.5	125	12.5	125	250
１４４ピンク	12.5	12.5	250	12.5	12.5	250
１４４白	12.5	25	250	12.5	25	250
２４４ピンク	12.5	25	250	12.5	25	250
２４４白	12.5	25	250	12.5	25	250

表2202-3　D65値（分）

菌株	クロモアガー上のコロニー	
	ピンク	白
１４４	０．４５	２．２５
２４４	１．０６	０．５９
３０６	０．７０	
５８	０．４５	０．４３
８７６		０．６４

(ｳ) 魚介類流通モデル菌接種実験

アジの氷詰め５時間流通後の菌数は、初期菌数の１／120に減少、30℃４時間放置で菌数はさらに１／16に減少することが見い出され、従来認められていた菌の消長と類似した成績が得られたことから、指標菌を用いた調査を行なうことができることが判った。

(ｴ) 加熱変性糖の腸炎ビブリオ挙動に及ぼす影響

(1)グルコース水溶液をリン酸水素ナトリウム、水酸化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウム等の存在下（pH7.6以上）で加熱（121℃15分）した液体は、腸炎ビブリオの死滅を促進し増殖を抑制した。(2)加熱による静菌作用は、乳糖やリボース等の他の還元糖にも認められ、程度の差異はあるが他の菌種にも認められた。(3)糖加熱生成物による増菌阻害効果は、アサリ抽出物中の腸炎ビブリオの増菌においても認められたことから、菌の検出や菌数測定においては還元糖の影響を考慮する必要があることがわかった。

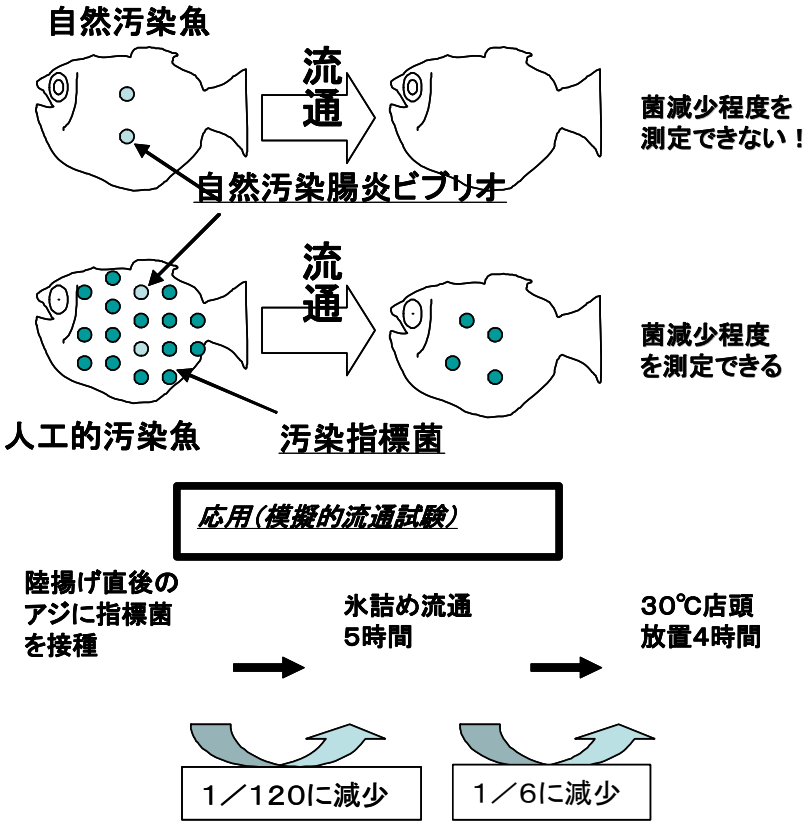


図2202-2　モデル実験模式図

エ　考　察

(ｱ) 指標菌

食品を汚染している病原菌は、通常の検査に用いられる25g の食品中に検出可能な菌数が含有されていることは希であるため、製造、生産、流通等の各過程、または生産から消費までの過程における病原菌の増減などの消長を究明するためには、病原体そのものではないけれども、類似した挙動を示すであろうと考えられる通常は無害の菌で、しかもその汚染のレベルと頻度が高い菌が用いられる。そのようなものとして、現在使われている菌として大腸菌群や一般生菌が挙げられる。しかし、これらの挙動と病原菌の挙動は似ているとはいえ、同一ではない。病原菌そのものを用いて調べた挙動が最も精確であるが、バイオハザードの観点から実質上、その取扱いは実験室内のみに限られてしまう。そこで、本研究では環境から分離された無害の腸炎ビブリオの長期保存株から、自然汚染腸炎ビブリオと寒天培地上で識別できる菌を選択し、その菌を用いる挙動解析方法を作出した(図2202-2)。

(ｲ) 加熱変性糖の腸炎ビブリオに及ぼす影響

挙動解析の実験を進める過程で、加工食品や調理済み食品に含まれることが多い糖の加熱生成物が、腸炎ビブリオに対して静菌的に作用することが認め

られた。従来、糖とリン酸（Byrd J. J.，Cheville A. M.，Bose J. L.，and W. Kaspar 1999）または糖とアミノ酸（Einarsson H.，Snygg B. G.，and C. Eriksson. 1983）の混合液の加熱生成物によって、静菌作用が認められていたが、本研究によって、糖を種々の塩または苛性ソーダの存在下で加熱することによっても静菌作用を持つ反応生成物ができることが判明した。したがって、糖を含む食材について腸炎ビブリオの挙動を予測微生物学的に推定する場合には、糖加熱生成物の影響を考慮しなければならないことが判った。

オ　今後の課題

腸炎ビブリオ指標菌を用いる魚介類加工品製造過程での挙動解析について、方法を含めて検討する必要がある（図　2202-2）。静菌作用を持つ加熱糖生成物についてはいくつか候補が挙げられているが、未だにその作用を主に担う化合物が不明である。今後、化学的な解明が必要であり、それが判明すれば新たな静菌物質の開発の可能性が出てくる。

カ．要　約

(ｱ) 指標菌

環境から採取した毒素遺伝子を持たない無害の腸炎ビブリオの長期保存株中から、食品を汚染している腸炎ビブリオと寒天培地上で区別できる変異株を選択し、それを指標菌として用いる方法を考案した。得られた変異株は、通常の腸炎ビブリオとほぼ同等の挙動を示し、それを用いた流通を模したモデル実験により、挙動解析に用いることができることが判った。

(ｲ) 加熱変性糖の腸炎ビブリオに及ぼす影響

加工食品や調理済み食品に含まれることが多い糖の加熱生成物が、腸炎ビブリオに対して静菌的に作用することが認められた。すなわち、糖を種々の塩または苛性ソーダの存在下で加熱することによって、静菌作用を持つ反応生成物ができることが判明した。

キ　引用文献

1) Einarsson H.，Snygg B. G.，and C. Eriksson. 1983. Inhibition of bacterial growth by Maillard reaction products. J. Agric. Food Chem. 31:1043-1047.

2) Byrd J. J.，Cheville A. M.，Bose J. L.，and W. Kaspar 1999. Lethality of a heat- and phosphate-catalyzed glucose by-product to *Escherichia coli* O157:H7 and partial protection conferred by rpoS regulon. Appl. Environ. Microbiol. 65:2396-2401.

研究担当者（熊谷進*、林谷秀樹、工藤由起子）

3　遺伝学的手法を用いた食品からの腸炎ビブリオ検出法の検討

ア　研究目的

腸炎ビブリオによる食中毒は、夏期に非常に多く発生し、食品衛生上の大きな問題となっている。本菌は、夏期の海水中に広く分布しているため、魚介類が本菌に汚染されている確率は非常に高い。通常、腸炎ビブリオの検査は培養法で行っているため、検査に3日以上が必要であり、検査法も非常に煩雑である。そこで、流通段階、あるいは市場から汚染食品を迅速に排除し、食中毒の発生防止を図るために、遺伝学的手法を応用した高感度・簡便・迅速な検査法を開発し、開発した検査法を検証、実用化を図る。

イ　研究方法

(ｱ) 遺伝学的手法を用いた検査法の開発

食品からの腸炎ビブリオの検出法として、PCR法、LAMP法、リアルタイムPCR法等の遺伝学的手法を応用した定性法および定量法を開発する。

(ｲ) 遺伝学的手法を用いた検査法の検証

開発した検査法を、食品検体で検証して問題点を明確にし、さらに改良を図り、検査法を確立、実用化させる。

ウ　研究結果

(ｱ) 遺伝学的手法を用いた検査法の開発

a　PCRの前処理：アルカリ処理法

食品の増菌培養液を対象に、腸炎ビブリオ*toxR*遺伝子を標的としたPCR法について検討した結果、培養液を遠心して集菌後アルカリ処理によってテンプレートを作製することにより、再現性よく、より高率にPCR法で腸炎ビブリオ遺伝子を検出できることが明らかとなった（表2203-1）。

b　PCR法による腸炎ビブリオの検出

食品301検体と拭き取り検体25検体を対象に、腸炎ビブリオの検出を従来の培養法とPCR法で比較検討した結果、両者の一致率はそれぞれ97%、96%と非常に高い値であった（表2203-2）。

表2203-1　PCR 法による腸炎ビブリオ toxR 遺伝子の検出

【テンプレートの作製】
培養液1mlを遠心し，その沈渣を50μlの25mM NaOHに懸濁して加熱(アルカリ処理)後，2.25iM Tris-HCl(pH7.0)を等量加えた。

【プライマー】
toxR 遺伝子検出用（Kim *et al*. 1999年）
vptoxR1 : 5'-GTCTTCTGACGCAATCGTTG-3'
vptoxR2 : 5'-ATACGAGTGGTTGCTGTCATG-3'　*toxR* = 368 bp

tdh 遺伝子検出用（伊藤ら，1992年）
TDF-1 : 5'-AGCTTCCATCTGTCCCTTTT-3'
TDF-2 : 5'-ATTACCACTACCACTCTCATA-3'　*tdh* = 434 bp

trh 遺伝子検出用（Tada *et al.* 1992年）
R-2: 5'-GGCTCAAAATGGTTAAGCG-3'
R-6: 5'-CATTTCCGCTCTCATATGC-3'　*trh* = 250 bp

【温度条件】
熱変性 …… 94℃, 0.5分
アニーリング …… 55℃, 0.5分　} 30サイクル
伸長 …… 72℃, 0.5分

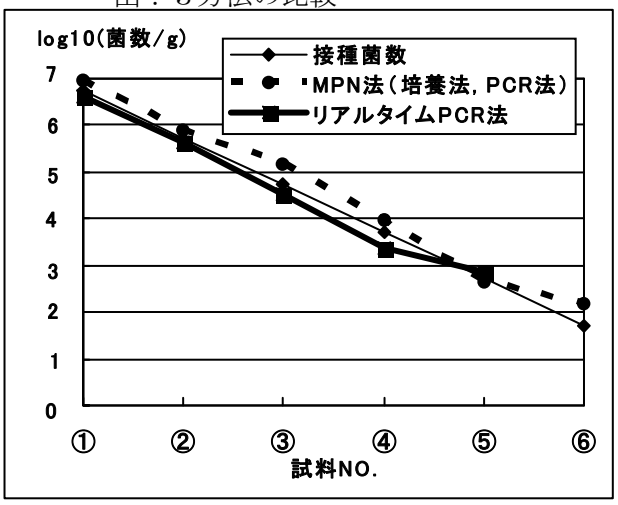
表2203-2　培養法および PCR 法による腸炎ビブリオの検査成績

培養法	*toxR*	検体数 食品	検体数 拭き取り
＋	＋	30	5
＋	－	1	1
－	＋	8	0
－	－	262	19
計		301	25
一致率		97.0% (292/301)	96.0% (24/25)

表2203-3　リアルタイム PCR 法の特異性の検討

菌種	供試菌株数	陽性菌株数
腸炎ビブリオ(39血清型)	47株	47株
V.cholerae O1	3 株	0株
V.cholerae O139	1 株	0株
NAG	1 株	0株
V.mimicus	1 株	0株
V.fluvialis	5 株	0株
V.furnissii	4 株	0株
V.vulnificus	5 株	0株
V.alginolyticus	169株	1株
A.hydrophila	1 株	0株
A.sobria	1 株	0株
A.caviae	1 株	0株
P.shigelloides	1 株	0株

図2203-1　アサリに接種した腸炎ビブリオの検出：３方法の比較



c　腸炎ビブリオを検出するリアルタイム PCR 法

腸炎ビブリオを特異的に検出するリアルタイム PCR 法を確立するために、*toxR* 遺伝子内にプライマーと TaqMan プローブを設計した。そして、腸炎ビブリオの39種類の血清型菌合計47株と腸炎ビブリオ類縁菌193株を用いて、本法の特異性を検討した結果、腸炎ビブリオに対する特異性が高いことを確認した（表2203-2）。

次に、アサリに腸炎ビブリオを実験的に接種し、その菌数を MPN-培養法、MPN-PCR 法、およびリアルタイム PCR 法で定量、比較検討した結果、いずれの方法においてもほぼ同等の成績を得たが、リアルタイム PCR 法では10^2個/g の検体では陰性となった（図2203-1）。

d　腸炎ビブリオを検出する LAMP 法の開発

腸炎ビブリオを特異的に検出する LAMP 法の開発を図った。腸炎ビブリオ *toxR* 遺伝子内にプライマーを設計した結果，LAMP 法の至適反応温度は63℃，感度は63℃で10^2程度であった。本法を用いて，腸炎ビブリオ7血清型7株，その他のビブリオ属菌及びビブリオ類縁菌を対象に特異性を検討した結果，特異性が確認された（表2203-4）。

腸炎ビブリオをパーナ貝に接種し，菌の検出を分離法，PCR 法，LAMP 法で比較検討した。3 菌株についてそれぞれパーナ貝各 3 検体について行った。パーナ貝10g の10倍乳剤を作成し、TCBS 寒天での直接塗抹、アルカリペプトン水10ml での増菌培養後分離、そして大量培養したものについては分離法、PCR 法、LAMP 法で検出を行った。直接、および増菌培養では検出できない微量の菌数においても、大量培養では PCR 法の 1 検体を除いて全て検出された（表2203-5）。

表2203-4　LAMP 法の特異性の検討の検出：３方法の比較

菌　種	供試菌株数	陽性菌株数
V.parahaemolyticus	7	7
V.cholerae O1	3	0
V.cholerae O139	1	0
NAG	1	0
V.mimicus	1	0
V.fluvialis	2	0
V.furnissii	1	0
V.vulnificus	2	0
V.alginolyticus	1	0
Aeromonas sp.	3	0
Plesiomonas shigelloides	1	0

表2203-5　パーナ貝に接種した腸炎ビブリオ

	血清型	検体10gに添加した菌数	直接	増菌	大量		
					分離	PCR法	LAMP法
1	O4:K8	7.5cfu/10g	0/3	0/3	3/3	2/3	3/3
2	O1:KUT	24cfu/10g	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3
3	O8:K20	14cfu/10g	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3
NC			0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

表2203-6　食品からのPCR法および培養法による腸炎ビブリオの分離（2003, 2004年）

	供　試	検査	陽性検体数		
	検体数	方法	*toxR*(%)	*tdh*(%)	*trh*(%)
2003年	180	PCR	32 (17.8)	7 (3.9)	1 (0.6)
		分離	32 (17.8)	6 (3.3)	1 (0.6)
2004年	281	PCR	44 (15.7)	8 (2.8)	1 (0.4)
		分離	41 (14.6)	5 (1.8)	1 (0.4)
計	461	PCR	76 (16.5)	15 (3.3)	2 (0.4)
		分離	73 (15.8)	11 (2.4)	2 (0.4)

表2203-7　食品からの腸炎ビブリオ検出：培養法による比較

直接培養	増菌培養	大量培養	検体数
＋	＋	＋	5
－	＋	＋	7
－	－	＋	24
－	N.D	＋	5
－	－	－	3
陽性数　5	12	41	44

(ｲ) 遺伝学的手法を用いた検査法の検証

a　PCR 法を応用した食品からの腸炎ビブリオ検出法

2003～2004年の2年間に食品461検体について検査した結果、腸炎ビブリオは73検体(15.8%)、TDH 産生菌は11検体(2.4%)、TRH 産生菌は2検体(0.4%)から検出された（表2203-6)。食品から腸炎ビブリオを定性的に検出するには、大量培養後、PCR 法でスクリーニングする方法が効果的であった（表2203-7)。

b　培養法と PCR 法による腸炎ビブリオ定量法の比較検討

東京湾の海水、海泥、貝を対象に腸炎ビブリオ菌数の定量（MPN）法として、従来用いられている培養法と、PCR 法（MPN-PCR 法）の有用性を比較検討した。検査した39件中、腸炎ビブリオは全ての検体から検出された。培養法と PCR 法で求めた腸炎ビブリオ菌数を比較した結果、菌数はほぼ一致していたが、39件中22件では PCR 法による菌数の方がやや高い値であった。これは試料中に腸炎ビブリオ以外の菌が非常に多いため、培養法では腸炎ビブリオの分離が非常に困難であったことが影響したものと推定された（表2203-8)。

c　リアルタイム PCR 法による食品中の腸炎ビブリオ菌数直接検出

夏期に食品15検体について、腸炎ビブリオ菌数をリアルタイム PCR 法と MPN-PCR 法で比較した。食品から培養することなく腸炎ビブリオを直接検出するリアルタイム PCR 法の検出感度は、10^2～10^3個/g であり、それ以下の菌数の場合には陰性となった。しかし、陽性の場合には、MPN-PCR 法よりやや高い菌数となる傾向が認められた（図2203-2）。

表2203-8　培養法と PCR 法によって測定された腸炎ビブリオ菌数の比較

菌数 (MPN/100g)	試料			計(%)
	海水	海泥	貝	
完全一致	5	4	5	14(36.0)
1オーダー以内	7	5	6	18(46.0)
1～2オーダー	1	3	2	6(15.4)
2オーダー以上	0	1	0	1(2.6)
計	13	13	13	39

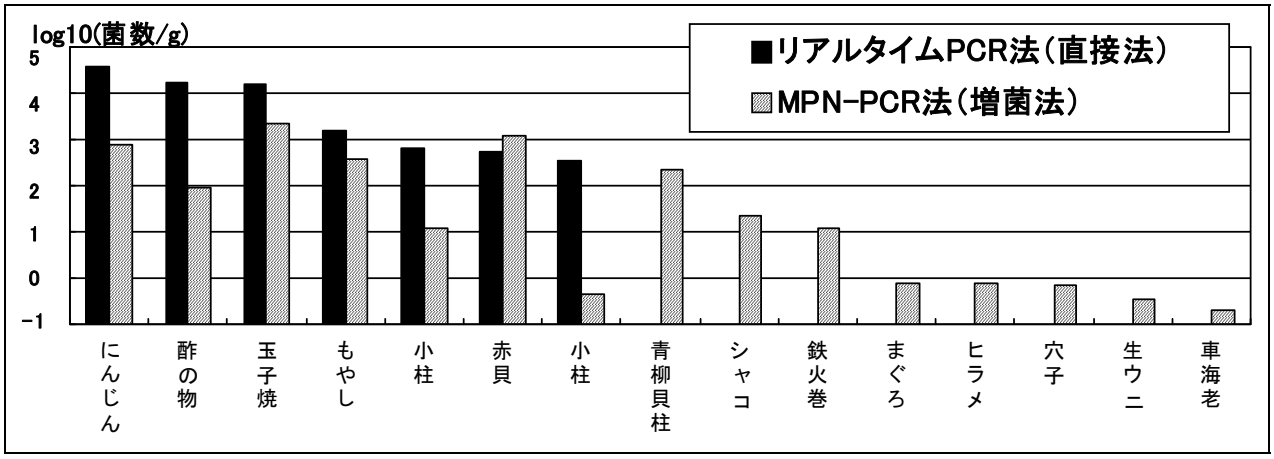


図2203-2　リアルタイム PCR 法と MPN-PCR 法による食品中の腸炎ビブリオ菌数の比較

エ　考　察

(ｱ) 遺伝学的手法を用いた検査法の開発

腸炎ビブリオの検出に、培養法は数日要するのに比べ、PCR 法は腸炎ビブリオの有無が 3 時間程度で判定でき、非常に迅速で効率的な検査法であることが確認された。

腸炎ビブリオ *toxR* 遺伝子内にリアルタイム PCR 法のプライマーとプローブを設計し、特異性を確認した。実験的に腸炎ビブリオを接種した検体で、MPN 法（培養法）、MPN-PCR 法、リアルタイム PCR 法で定量成績を比較検討した結果、ほぼ同等の成績が得られた。検査に要した日数は、MPN 法（培養法）では 4 ～ 5 日、MPN-PCR 法では 2 日間を要するが、リアルタイム PCR 法では約 3 時間で成績が得られた。しかし、リアルタイム PCR 法では約10^2の個/g の菌数では陰性となり、検出感度の面で更に検討を要することが示唆された。

腸炎ビブリオを検出する LAMP 法は，迅速・高感度な定性検出法であることが明らかとなった。実用化に向けて今後検討する必要がある。

(ｲ) 遺伝学的手法を用いた検査法の検証

腸炎ビブリオ菌数の定量法（MPN 法）について、従来の培養法と PCR 法（MPN-PCR 法）を比較した結果、ほぼ同等の成績を得られた。従来法は手技が非常に煩雑で検査日数も MPN-PCR 法より 2 ～ 3 日長くかかることから、PCR 法を応用した腸炎ビブリオ定量法（MPN-PCR 法）は非常に有用であることが明らかとなった。

食品検体で腸炎ビブリオ菌数の定量を、MPN-PCR 法とリアルタイム PCR 法による直接検出で比較した。リアルタイム PCR 法による直接検出では培養過程がないため死菌を検出する問題と、1 g 当たり約10^2以下の菌数では陰性となる検出感度に問題が残り、その改良が今後の課題である。

食品や環境からTDH、TRH産生菌を検出することは非常に困難である。しかし検体の大量培養とPCR法によるスクリーニングにより、TDH、TRH産生菌を効果的に検出できることが示唆された。

オ　今後の課題

食品からの腸炎ビブリオの高感度・迅速・簡便な定性的検査法として、大量培養-PCR法およびLAMP法を、簡便迅速な定量検査法として、MPN-PCR法およびリアルタイムPCR法を開発した。これら開発した方法を更に食品検体で検証して問題点を明確にし、さらに改良を図り、実用化する必要がある。

カ　要　約

食品からの腸炎ビブリオの高感度・迅速・簡便な定性的検査法として、大量培養-PCR法、およびLAMP法を開発した。

簡便迅速な定量検査法として、MPN-PCR法およびリアルタイムPCR法を開発した。MPN-PCR法は、従来の培養法とほぼ同等の成績を迅速・簡便に得られたが、リアルタイムPCR法の検出感度はやや低く、更に検討が必要である。

キ　引用文献

1）小西典子ら　2005.　東京湾の海水，海泥および貝からの病原ビブリオの検出と分離された腸炎ビブリオ菌株の諸性状.　日本食品微生物学会雑誌. 22:138-147.

2）尾畑浩魅ら　2004.　食中毒事例における原因食品からのTDH・TRH産生腸炎ビブリオの検出と定量.　第38回腸炎ビブリオシンポジウム.

3）尾畑浩魅ら　2006.　腸炎ビブリオ食中毒事例における PCR 法を用いた食品からの耐熱性溶血毒（TDH）産生菌の分離.　感染症学雑誌. 80:383-389.

4）下島優香子ら　2004.　リアルタイムPCR法を用いた腸炎ビブリオの検出および定量の検討，第38回腸炎ビブリオシンポジウム.

研究担当者（甲斐明美*、尾畑浩魅、下島優香子、矢野一好、諸角聖）

4　mRNA 定量法による食中毒菌の毒素産生・病原遺伝子発現データの構築と食品評価システムの開発

ア　研究目的

食品にはpHや水分活性、塩濃度など様々な要因が含まれており、毒素型食中毒菌ではどのような要因が毒素産生量を抑制あるいは増長するのか、あるいは腸管感染型食中毒菌ではどのような要因で最も病原性遺伝子が強く発現されるのかについてのデータが不足している。このため、食品中にたとえ同じ菌量が存在していても毒素蓄積が異なり、また、感染型中毒菌においては摂食後の感染力が異なっている場合がある。現行のハザード評価システム（単なる菌の検出・定量）では、この点は検知できない。

そこで、本研究では、mRNA解析・定量技術を開発し、これにもとづいて、これらのデータの構築し、食品微生物ハザード防止に直結したモニタリング技術を確立する。

イ　研究方法

(ｱ) 毒素型食中毒菌毒素遺伝子mRNA発現解析

ボツリヌス毒素遺伝子を用いて、毒素遺伝子発現モニタリング技術の確立をめざした。ボツリヌス菌の毒素遺伝子のmRNA 発現を検知できるようにするために、①逆転写反応のプライマー設計、②m-RNAの抽出方法の検討、③抽出したRNAに①で設計したプライマーにより逆転写反応およびcDNAのTaqMan PCR法による定量をおこない、m-RNAの定量性、再現性に関する条件検討を行なった。

(ｲ) 腸管感染型食中毒菌の病原性遺伝子mRNA 発現解析

腸管感染型食中毒菌の病原性遺伝子mRNA 発現解析システムの確立をめざした。重要な病原性遺伝子として腸炎ビブリオの耐酸性遺伝子 *cadA* 発現系を用いた。①m-RNAの抽出方法の検討、②抽出したRNAの純粋培養での発現条件の解析をノーザンブロット解析で行なった。

(ｳ) 毒素型食中毒菌毒素遺伝子mRNA発現解析

ボツリヌス菌の毒素遺伝子のmRNA 発現を検知できるようにするために、逆転写反応のプライマー設計、m-RNAの抽出方法の検討の後、m-RNAの定量法の確立をめざした。また、確立したシステムにより、実際に食品での各種環境条件（pH，食塩濃度など）での毒素遺伝子m-RNA発現を調べた。

(ｴ) 腸管感染型食中毒菌の病原性遺伝子mRNA 発現解析

腸管感染型食中毒菌の病原性遺伝子mRNA 発現解析システムの確立をめざした。腸炎ビブリオの耐酸性遺伝子 *cadA* 発現系を用い、m-RNA の抽出方法の検討の後、RNA の発現条件解析をリアルタイム定量PCR 解析で行なった。

(ｵ) 確立した毒素遺伝子発現システムにより、各種環境条件での RNA 発現モニタリングの有効性を検証した。水分活性、アルコールなど多くの環境要因とボツリヌス毒素遺伝子発現の関係を検討した。

ウ　研究結果

(ｱ) ボツリヌス毒素遺伝子毒素遺伝子のmRNA 発現を検知するために、①逆転写反応のプライマー設計、②m-RNA の抽出方法の検討を行い、いずれの問題も解決した。また、③抽出した RNA に①で設計したプライマーにより逆転写反応および cDNA の TaqMan PCR 法による定量をおこない、m-RNA の定量性、再現性に関する条件検討もほぼ達成することができた（図2204-1)。各培養時期での毒素発現を検討した結果、ボツリヌス毒素は定常期での発現が高いことが明らかとなった（図2204-2)。

(ｲ) 腸炎ビブリオのリジン脱炭酸酵素が本菌の耐酸性に強く関与していることを実験的に証明した（表2204-1)。つぎに、本酵素遺伝子 *cadA* の m-RNA の抽出方法の検討を行なった後、抽出した RNA の純粋培養での発現条件の解析をノーザンブロット解析で行った。その結果、本遺伝子は酸性条件下でのみ発現することが明らかとなった（図2204-3)。

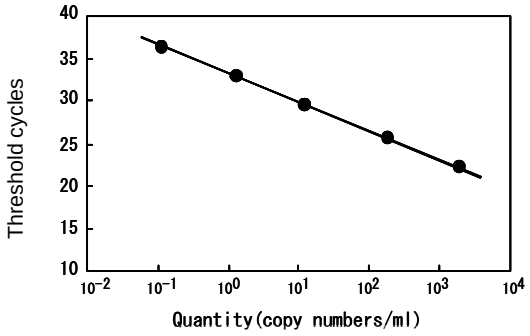


図2204-1　ボツリヌスＡ型菌毒素遺伝子の m-RNA の定量検量直線

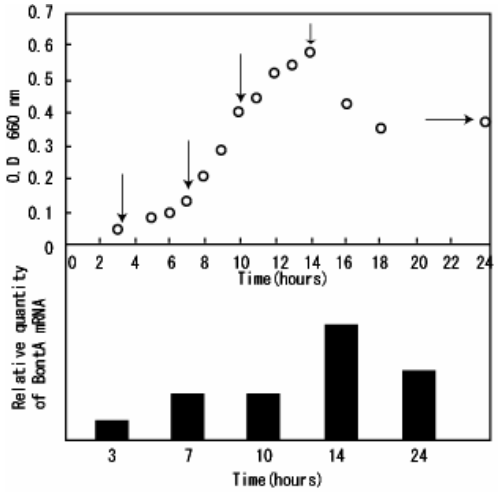


図2204-2　各増殖期におけるボツリヌス毒素の発現量

表2204-1　腸炎ビブリオの耐酸性におけるリジンの必要性

Strain	Presence/ absence of lysine[a]	% survival at pH 4.0		
		30min[c]	60min[c]	90min[c]
Vp+1	+	14.6	6.14	2.27
	-	0.45	0.023	0.002
Vp+3	+	23.7	5.26	3.01
	-	4.95	0.026	ND[b]
Vp+6	+	10.0	9.71	1.74
	-	2.71	0.066	0.0003
Vp+8	+	6.97	2.64	0.921
	-	0.011	ND[b]	ND[b]
Vp+9	+	1.70	0.784	0.167
	-	0.011	ND[b]	ND[b]
Vp+10	+	24.6	10.6	5.78
	-	13.3	8.66	0.001
Vp+11	+	17.1	11.1	7.45
	-	0.16	0.005	0.0002
Vp+12	+	14.4	10.3	5.26
	-	0.83	0.006	0.0003
Vp+13	+	33.2	19.7	18.1
	-	11.4	0.627	0.011
Vp+17	+	25.7	29.2	12.9
	-	1.14	0.011	0.0004

[a] Cells were acid challenged in NCE, pH 4.0 with(+) or without (-) lysine.
[b] N.D., Not detected (20cfu/ml), <0.0001 in percent
[c] Time after resuspension in NCE (pH 4.0).

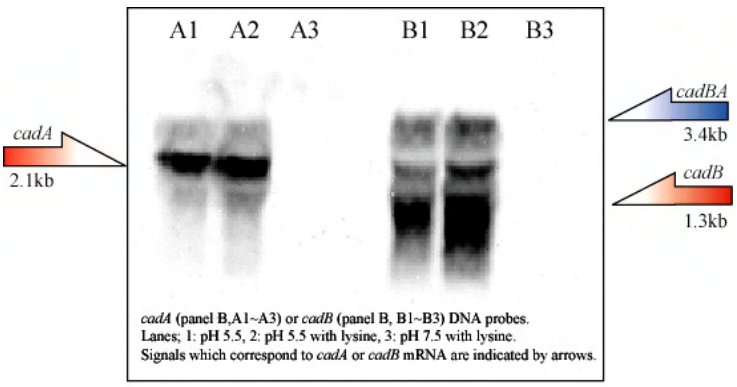


図2204-3　腸炎ビブリオのリジン脱炭素酵素の発現に及ぼす pH の影響

(ウ) ボツリヌス毒素遺伝子の mRNA 発現を検知するために、①逆転写反応のプライマー設計、②m-RNA の抽出方法の検討、③m-RNA の定量性、再現性に関する条件検討をおこない、いずれの問題も解決した。そこで実際に食品での各種環境条件での毒素遺伝子 m-RNA 発現を調べ、ボツリヌス毒素発現は、pH の影響をほとんど受けないが、塩分濃度が高くなる程高発現することが明らかとした（図2204-4及び図2204-5)。

(エ) リアルタイム定量 PCR 法を確立し、本遺伝子は低 pH およびリジンの存在下で誘導されることが確認できた。しかし、生鮮魚介類中の遊離リジン含量と腸炎ビブリオの胃酸での耐酸性に必要なリジン含量を比較したところ、食品中に含まれる遊離リジン含量は腸炎ビブリオの胃酸での耐酸性に必要なリジン含量より少ないことが明らかとなった。また、リジン脱炭酸酵素遺伝子の発現量でも食品別には大きな差異が認められなかった（図2204-6)。

(オ) ボツリヌス毒素発現条件のうち、pH については改めて酸性から中性領域で発現量が一定であったことを確認するとともに、アルカリ側においても発現量に有意な違いがないことが明らかとなった（図2204-7)。エタノールの濃度変化に伴い毒素遺伝子の発現量は毒化しないといわれる 5.5%以上の濃度で大きく減少した（図2204-8）。グリセロールの濃度変化では 5～25 %添加の範囲で、コントロールのおよそ 10 倍の発現量を示した（図2204-9)。

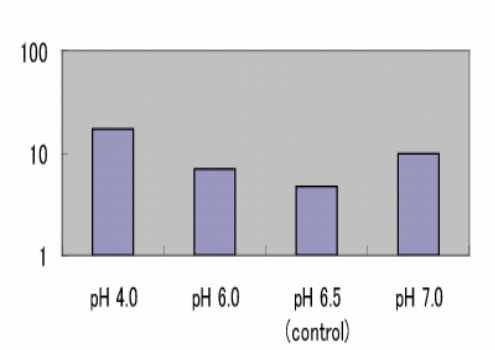


図2204-4 ボツリヌス毒素mRNA発現に及ぼすpHの影響

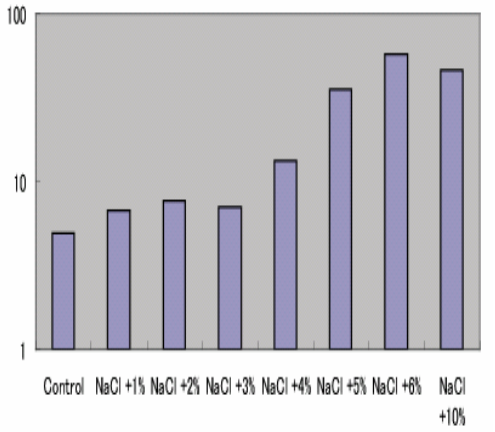


図2204-5 ボツリヌス毒素mRNA発現に及ぼすNaClの影響

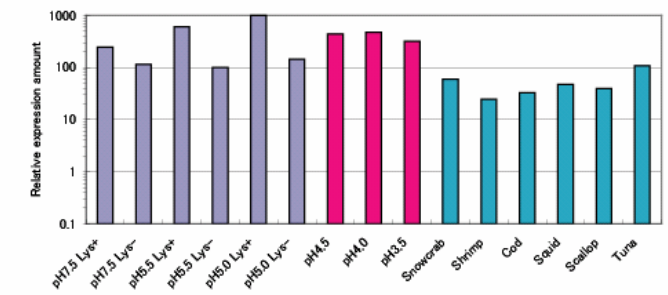


図2204-6 腸炎ビブリオの耐酸性関与遺伝子*cadA*発現に及ぼす環境因子、および、付着食品(魚介類)の影響

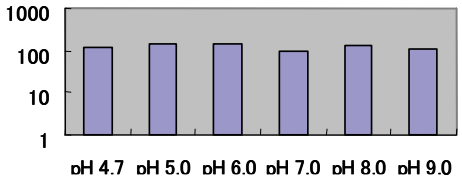


図2204-7 ボツリヌス毒素mRNA発現に及ぼすpH(アルカリ領域を含む)の影響

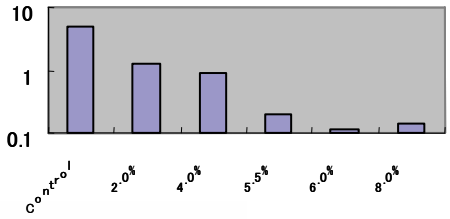


図2204-8 ボツリヌス毒素mRNA発現に及ぼすエチルアルコールの影響

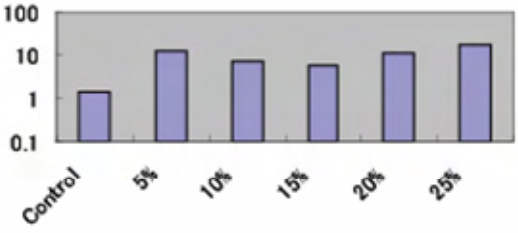


図2204-9 ボツリヌス毒素mRNA発現に及ぼすグリセロールの影響

エ　考　察

本研究プロジェクトにより、ボツリヌス毒素遺伝子の発現定量システム（RNA 定量システム）の確立に成功し、pH はボツリヌス毒素遺伝子の発現に影響をおよぼさないが、塩分は遺伝子発現を促進することを世界ではじめて明らかとした。このことは、すでに確立したボツリヌス毒素遺伝子（DNA）による簡便迅速ボツリヌス評価システムだけでは、高塩分食品などでは正しくリスクを評価できないことを示しており、食品によっては、本研究で確立した RNA 定量システムの併用が必要であることを示している。今後、さらに多くの環境要因について、毒素遺伝子の発現との関連をしらべ、評価システムの実用化へ向けてのデータの完備が必要である。

オ　今後の課題

(ア) ボツリヌス菌については、食品中で想定される代表的な環境因子での発現解析を通じて、本年度までの研究成果でほぼm-RNA発現解析の手法およびその有効性評価については確立できたと考えている。残す課題は、実際の食品中でのデータ解析であるが、これについては実用化へむけた試験において随時検討していくべき問題と考えている

(イ) 腸炎ビブリオを用いた耐酸性遺伝子（*cadA*）についても、発現解析システムは確立できたが、ボツリヌス毒素システムと異なり、実際の食品（魚介類）での実用化へ向けては、食品間で耐酸性や遺伝子発現量に大きな差異がみとめられないなど、課題を残した。

カ　要　約

本研究では、ボツリヌスの迅速リスク評価法については、すでに確立した DNA モニタリングの欠点をカバーするために、毒素遺伝子発現モニタリング（RNA モニタリング）によるリスク評価法の確立をめざし、ボツリヌス菌のmRNA 発現を検知するリアルタイム定量 PCR 法を *in vitro* 系で確立した。これらの成果をもとに、技術の有効性評価試験研究に発展させることに成功した。

また、腸炎ビブリオ株の胃酸への耐性の違いの迅速評価法の開発についても、手法としてはリジン脱炭酸酵素発現解析法を確立した。しかし、胃酸耐性遺伝子発現に必要なリジン量と、実際に食品をヒトが消化する際に想定されるリジン量との間に差異があることが明らかとなり、本手法の実用化へ向けて課題を残した。

キ　引用文献

1) 葛西慶明，木村　凡，田島洋介，川崎　晋，松原布美子，藤井建夫：定量 PCR 法を用いたボツリヌス A 型及び B 型菌の同時検出及び定量法日本食品衛生学会第85回学術講演員講演要旨（平成15年 5 月14, 15日、東京）

2) 葛西慶明，木村　凡，藤井　建夫．m-RNA のリアルタイムPCR定量による *Clostridium botulinum* type A における毒素遺伝子の発現解析．第26回に本食品微生物学会学術総会講演要旨（平成17年11月10, 11日、金沢）

3) Kasai, Y., B. Kimura, S. Kawasaki, T. Fukuya,

K. Sakuma, and T. Fujii. 2005, Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in steamed rice aseptically packed under modified atmosphere. *J. Food Protect.* 68(5) 1005-1011
4) 木村 凡. 包装微生物の科学（単著），2005. 日本包装学会10周年記念出版会編
5) Takahashi, H., B. Kimura, M. Yoshikawa, and T. Fujii. 2003 : Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase gene of gram-negative, histamine-producing bacteria and their application in detection and identification of these organisms in fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (5), 2568-2579
6) Takahashi, H., B. Kimura, M. Yoshikawa, S. Gotou, I. Watanabe, and T. Fujii. 2004. Direct detection and identification of lactic acid bacteria in a food processing plant and in meat products using denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Food Protect.* 67(11), 2515–2520.
7) 丸山弓美，木村 凡，藤井建夫，徳永宜則，松林潤，相川保史. 2005. 食卓用ドライアイス装置内の魚介類における腸炎ビブリオの増殖抑制. 食品衛生学雑誌、46(5)，213-217
8) Yamane, K., J. Asato, N. Kawade, H. Takahashi, B. Kimura, and Y. Arakawa. 2004. Two cases of fatal necrotizing fasciitis caused by *Photobacterium damsela* in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 42(3), 1370–1372
9) 渡辺智子，木村 凡，辻奈津子，藤井建夫，尾畑浩魅，甲斐明美，諸角 聖. 2004. 腸炎ビブリオの酸耐性とリジン脱炭酸酵素の役割. 第25回に本食品微生物学会学術総会講演要旨（平成16年 9 月28, 29日、東京）

研究担当者（藤井建夫*、木村凡）

5 *Campylobacter* 高感度定量試験法の開発並びに本菌食中毒防止対策の検討

ア 研究目的

Campylobacter 食中毒は2000年以降、病因物質別発生件数において 1 位または 2 位を占め、その発生原因として鶏肉の関与した事例の多いことが指摘されている。本菌のヒトでの感染菌量は500～800個/ヒトと言われ、しかも、その生理学的性質から食材中での増殖は極めて困難である。本菌食中毒を防止するには養鶏場における本菌の制御が究極的課題であるが、現段階では汚染食肉・食品の排除が最も効果的対策と考えられる。本研究では、食肉やその他の汚染食品、あるいは二次汚染した調理器具などにおける *Campylobacter jejuni* 汚染を高感度かつ迅速に感知しうる検査法を確立することを目的とした。

イ 研究方法

(ｱ) Multiplex PCR 法による *C. jejuni* および *C. coli* の簡易迅速同定法の確立。

(ｲ) *Campylobacter* 属、*Arcobacter* 属および *Helicobacter* 属の属レベルでの簡易鑑別法の検討。

(ｳ) *C. jejuni/coli* 増菌培養法の検討。

(ｴ) *Campylobacter jejuni* を対象とした「リアルタイム PCR 法」および「等温遺伝子増幅法(LAMP)法」による迅速・高感度定量法の検討。

ウ 研究結果

(ｱ) Multiplex PCR 法による同定

a PCR の反応系の設定

PCR 反応に用いる試薬は、通常 Taq polymerase 購入時に付属されている Buffer、dNTP により調製する方法をとるが、この方法は繁雑で利便性に欠け、検査者による調製ミスや試薬の Quality control の面からも問題が多い。こうした理由から、最近では個人差をなくすため Template および Primer を添加するだけで PCR 法が実施できる Ready to use 仕様の試薬が各社から販売されてきた。それらの検査キットは、凍結保存品、溶液保存（冷蔵）、小球状（Bead：室温保存）製品など多岐に渡っている。このうち、Beads 製品（Amersham Biosciences:PCR beads）は室温保存でも 2 年間は安定であり、また、Polymerase の安定性を増強するため BSA(Bovine serum albumin)が添加されていることなど、信頼性は高いが、販売価格の高いことが欠点といえる。そこで、低コスト化を図るため、beads 1 回分を 5 回に使用し、全反応液量5ulで実施する micro-scale-down 方式の採用を試みた。その結果、従来法と遜色ない性能が得られることを確認することができた。

b Multiplex PCR 法に使用可能な菌種特異的 primer の選択

今回検討した *C. jejuni* および *C. coli* のそれぞれに特異的な primer は計10種類が報告されている（Van der Plas J., 1991他）。Primer の特異性を検討するため

に供試した菌株は *Campylobacter* 属菌（20種）、*Arcobacter* 属菌（4種）および *Helicobacter* 属菌（11種）の35菌株である。

Multiplex PCR 法に用いる Primer の条件には、特異性・増幅効率および Primer 間の物理的性質（Tm 値、Dimer 形成能など）並びに判読容易な Amplicon サイズの差が重要である。各 Primer 濃度を一定(0.25 μM)にして25種類の組み合わせを作製しそれぞれの性能評価を行った。その結果、今回検討した限りにおいては、これらの要件を満たす Primer は PJ4および PC5の組み合わせのみであった（表2205-1）。

(イ) Multiplex PCR 法による *Campylobacter* 属菌、*Arcobacter* 属菌および *Helicobacter* 属菌の鑑別

従来 *Campylobacter* 属菌として分類されていた菌種群は、1980年代後半から1990年初頭にかけて *Campylobacter* 属、*Arcobacter* 属および *Helicobacter* 属など、いわゆる“Campylobacteria”として再編成された。現在、*Campylobacter* 属（17菌種3亜種3生物型）、*Arcobacter* 属（6菌種）および *Helicobacter* 属（21菌種）計40菌種強にも達している。しかも、*Campylobacter* の検査において一部の *Arcobacter* 属菌や *Helicobacter* 属菌も検出され、*C. jejuni*、*C. coli* との鑑別が困難であることから属レベルでの簡易鑑別法を検討した。

表2205-1 Multiplex PCR 法の検討に用いた primer のうち良好な成績が得られた primer

primer	報告者（報告年）	標的菌	塩基配列
PJ4	Winter, D.K.（1995）	*C.jejuni*	5'-CAAATAAAGTTAGAGAATGT-3' 5'- GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT-3'
PC5	Linton, D.（1997）	*C.coli*	5'-GGTATGATTTCTACAAAGCGAG-3' 5'-ATAAAAGACTATCGTCGCGTG-3'

公表された菌属特異的各種 Primer の組み合わせにより、Multiplex PCR 法が可能か否かについて検討した。その結果、*Campylobacter* 属および *Helicobacter* 属菌のそれぞれに特異性ある各1種計2種の Primer set の組み合わせにより *Arcobacter* 属を含めた3属菌のいずれかあるいはそれ以外の菌属に鑑別可能な Multiplex PCR 法が確立できた。

今回比較検討の対象とした Primer は、いずれも16S rDNA を標的配列としたもので *Campylobacter* 属：4種、*Arcobacter* 属：2種、*Helicobacter* 属：4種の計10種類である。その結果、2種混合 Primer set のうち、GC1または GC3と GH1の組み合わせにおいても3種混合 Primer と同一の Amplicon サイズと考えられるバンドが *Arcobacter* 属菌に認められた(表2205-2)。

表2205-2 菌属鑑別用 PCR 法の検討に用いた primer のうち良好な成績が得られた Primer

primer	報告者（報告年）	標的菌	塩基配列
GC1	Linton.D.(1995)	*Campylobacter*属	5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3' 5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3'
GC3	Vanniasinkam,T.(1999)	*Campylobacter*属	5'-GAGGATGACACTTTTCGGAGCG-3' 5'-TCGCGGTATTGCGTCTCATTGTATATGC-3'
GH1	Riley,L.K.(1996)	*Helicobacter*属	5'-CTATGACGGGTATCCGGC-3' 5'- ATTCCACCTACCTCTCCCA-3'

この点を検討した結果、GC1/GC3のセンス Primer および GH1のアンチセンス Primer により交差 PCR 反応が成立し、しかもその Amplicon サイズが *Arcobacter* 属に特異的であることが確認された。すなわち、*Campylobacter* 属および *Helicobacter* 属菌のそれぞれに特異性ある Primer set 各1種計2種の混合 Primer

セットにより 3 菌属の鑑別が極めて容易となった。

(ｳ) *C. jejuni/coli* の的確な検査法の基盤となり得る増菌培養法の確立を目的に、増菌培地の性能及び試料調製法を検討した。その結果、Preston または Bolton 基礎培地を用いて試料を洗い、洗液10ml にサプリメントを添加後培養する濃厚法（図2205-1）を確立した。

本法による本菌検出率は現行法の 2 倍以上の値を示した（表2205-3、表2205-4)。本法は上記 Multiplex PCR 法との併用により、高感度で簡易な迅速検査システムとして食品検査に活用しうることが判明した。

(ｴ) リアルタイム PCR 法および等温遺伝子増幅法（LAMP 法)に使用するサンプルの前処理条件について検討した結果、菌体をオートクレーブ処理することで良好な結果が得られた。リアルタイム PCR 法の Primer/Probe は Wang, R. F. (1992) らが報告した Fragment(187bp) を標的配列に、Primer Express (Ver. 2. 0)、Primer 3を用いて設計した(表2205-5)。

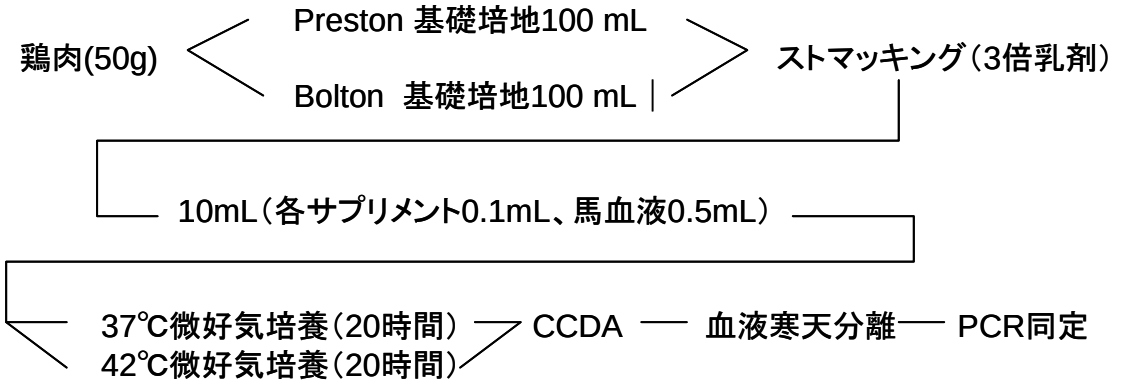


図2205-1 鶏肉からの *C. jejuni/coli* 検査システム

表2205-3 増菌法別 *Campylobacter* 属菌の検出率（供試検体：冷蔵鶏肉14検体）

検出菌	現行法	濃厚法（今回開発）	
	Preston 培地	Preston 培地	Bolton 培地
C.jejuni	23.5 %	71.4 %	50.0 %
C.coli	0.0 %	0.0 %	28.6 %

表2205-4 増菌法別 *Campylobacter* 属菌の検出率（供試検体：冷凍鶏肉62検体）

検出菌	現行法	濃厚法（今回開発）	
	Preston 培地	Preston 培地	Bolton 培地
C.jejuni	1.6 %	16.1 %	25.8 %
C.coli	1.6 %	1.6 %	24.2 %

表2205-5 *C. jejuni* のリアルタイム PCR 法に用いた Primer/Probe

Fw	5'-CCTGTGAAAGAATTTATCCTAAAGATGAG-3'
Rv	5'-GGATAAGCACTAGCTAGCTGATTATCG-3'
Pr	FAM-AAGGAGAAGGAGCTATAGGTTTAGGCGTGCC-BHQ

本法の特異性について、分離株を用いて検討したところ、*Campylobacter*類縁菌(87株)や他の腸管系病原菌(33株)のうち、明らかな陽性反応を示したのは*C. jejuni*のみであった。これにより、5時間程度で菌の特定が、また4.4×10^{0}～4.4×10^{6}copies/25μlの範囲で汚染菌数の定量が可能となった。

LAMP 法は極めて簡易・迅速に操作できるもののPrimerの設計が難しいため、これまで*C. jejuni*の検査には応用されていなかった。今回、Primer Explore(V3)により、Fouts、D. E.(2005)らの報告に基づくACCESSION NO. CJE0464を標的に6種の Primer setを作成した(表2205-6)。結果は約1時間で得られ、特異性および感度は リアルタイム PCR 法と同様であった。ただし、定量性は認められず、また手技の不慣れによるものか不明であるが、再現性に欠ける面があった。しかしながら、特殊な機器を必要とせず、簡便で迅速な方法としては、品質管理の現場でも充分応用可能と考えられた。

表2205-6　*C. jejuni* の LAMP 法に用いた Primer set

F3	5'-GCTATACAAACCCTGATGG-3'
B3	5'-TCATCGTTCTAGTATCGACA-3'
FIP	5'-GCGCCATACYCACAACCAAA-CAAGATTTAGCTCCTTGTCA-3'
BIP	5'-CAAAGGCTATGAGCACAGGTAAATA-CCCGTTACTTTTCCGTCT-3'
LF	5'-ACGCTCACAATACGCACAGTA-3'
LB	5'-ACGCACTTATAGCAATGTAACGCAA-3'

エ　考　察

(ア) *C. jejuni*および*C. coli*を対象にしたMultiplex PCR法に使用可能な菌種特異的Primerの選択を行った結果、PJ4(*C. jejuni*)とPC5(*C. coli*)が有効であった。PJ4は *C. jejuni* ssp. *doylei* と、PC5は *C. hyoilei* とも反応したが、*C. jejuni* subsp. *doylei* が検査材料から分離されることはまれで、たとえ分離されても*C. jejuni*として問題はないと考える。また、*C. hyoilei*は分類学的に *C. coli* と同義語とされているために同定上での支障はないと考えられた。

反応系は既製の試薬キットの有効活用を最大限図り、micro-scale-down 方式(反応液総量5μl)を導入し、従来法より低いコストで検査が可能となり、しかも増幅サイクル所要時間を大幅に短縮することができた(所要時間；25回40分および35回50分)。本法ではAnnealing温度を標準的な55℃(GC%≦50)より2℃高めの57℃に設定しているが、予備実験により、55℃では水分の蒸発に伴う $MgCl_2$濃度の上昇によると考えられるPrimerのMisannealling が観察されたためである。

PCR法で最も簡便で汎用されているDNA抽出法はboilling法であるが、*Campylobacter*属菌においては熱抵抗性株があり、再現性ある結果が得られないことが判明したため、アルカリ溶解法を用いることとした。本法は極めて簡便で、再現性ある結果が得られることが確認されている。しかし、この方法ではNaOH添加後に中和操作が新たに加わるため、サンプル間の相互汚染等に細心の注意を払う必要がある。

現行法で同定されたヒト散発下痢症由来 *C. jejuni*(48株)、*C. coli*(37株)に対してMultiplex PCR法を行ったところ、*C. jejuni*(48株)は全株一致した結果が得られたが、*C. coli*では37株中5株が*C. jejuni*と同定された。この5株は、すでに Totten(1987年)、Sicinschi(1995年)および Autenrieth(1996年)らが報告している馬尿酸塩加水分解能(Hip)陰性の *C. jejuni* であろうと推察された．この成績は両菌種の同定に際して、特にHip陰性株ではPCR法の併用が必要不可欠であることを強く示唆するものである。

(イ) これまで著者らが *Campylobacter* spp.として扱ってきたヒトの下痢症由来57株にMultiplex PCR法による *Campylobacter* 属菌、*Arcobacter* 属菌および *Helicobacter* 属菌の鑑別法を応用したところ、*Campylobacter* 属菌：28株、*Arcobacter* 属菌：7株および *Helicobacter* 属菌：22株に分類された。この結果からも、今回確立した混合 Primer set による Multiplex PCR 法の有用性が明らかとなった。このう

ち、特にヒトの糞便から *Helicobacter* 属菌が分離されていることを確認したのは本邦では初めてのことであり、極めて興味深い成績といえよう。

(ｳ) 本研究で確立させた *C. jejuni/coli* 迅速同定法と増菌培養法用いて、鶏屠体等の検査を実施した結果、鶏肉の75%、作業所内のふき取り試料の50%が *C. jejuni/coli* 陽性であった。これらの結果からも、Preston または Bolton 基礎培地を用いて試料を洗い、洗液10ml にサプリメントを添加後培養する高濃度の試料調製法は、有効性があるものと考えられた。本培養法は Multiplex PCR 法との組み合わせにより、菌の定量はできないが、高感度で簡易な迅速検査システムとして食品検査に活用し得ることが判明した。

(ｴ) *C. jejuni* 特異的遺伝子の増菌培養液からのリアルタイム PCR 法および LAMP 法はそれぞれ機器、試薬面での高コストが難点である。今後、下記（今後の課題）に示した方向で検討する必要がある。

オ　今後の課題

今後の課題としては、本研究によって確立させたリアルタイム PCR 法を、生菌、死菌が鑑別できる方法へと発展させ、本菌の生残性に関わる生理学的な特徴を把握する。また、LAMP 法は、簡易同定への応用並びに最確数(MPN)法との組み合わせによる定量法へと発展させることによって、食肉・食品の品質管理などの汚染モニタリングに活用できるか否かを検討する必要がある。

カ　要　約

Multiplex PCR 法により、*C. jejuni* および *C. coli* の簡易迅速同定法を確立させた。また、鶏肉から分離される *Campylobacter* 属菌、*Arcobacter* 属菌および *Helicobacter* 属菌の簡易鑑別法についても同法により確立した。

鶏肉からの効率的な *C. jejuni/coli* 培養方法として、試料50g を Preston または Bolton 基礎培地を用いて処理する高濃度試料調製法を提案した。

C. jejuni の迅速・高感度定量法として、「リアルタイム PCR 法」および「等温遺伝子増幅法(LAMP)法」について検討した。

キ　文　献

1) 高橋正樹ほか　1999. PCR による *C. jejuni* 並びに *C. coli* 同定のための各種プライマーの評価. 第73回日本感染症学会総会.

2) 高橋正樹ほか　2000. PCR による *Campylobacter* 属菌の同定. 第74回日本感染症学会総会.

3) 高橋正樹ほか　2001. PCR による *Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter* 属菌の鑑別について. 第75回日本感染症学会総会.

4) 高橋正樹ほか　2002. PCR を用いたヒト糞便からの *Campylobacter jejuni* 特異的遺伝子検出法について. 第76回日本感染症学会総会.

5) 横山敬子ほか　2000. 下痢症患者由来 *C. jejuni/coli* のニューキノロン剤に対する薬剤感受性の年次別推移. 第74回日本感染症学会総会.

6) 横山敬子　2004. カンピロバクター. 第43回感染性腸炎研究会総会

7) 横山敬子ほか　2004. 鶏肉におけるカンピロバクター検査法の検討ならびに汚染状況について. 第25回日本食品微生物学会学術総会

8) 横山敬子　2005. カンピロバクター食中毒の発生状況. 第26回日本食品微生物学会

研究担当者（矢野一好*、高橋正樹、横山敬子、諸角聖）

6　ウシ初乳･牛乳中のヨーネ菌の殺菌条件の検討

ア　研究目的

1980年代以降発生が増加しているウシヨーネ病は、我が国のみならず世界的に経済的損害を与えている慢性下痢性伝染病である。ヨーネ病は我が国では、昭和43年に法定家畜伝染病に指定され、国家防疫が進められてきている。ヨーネ病の防疫が困難である理由には、潜伏期間の長さや免疫学的診断の困難な感染牛の存在があげられる。我が国で家畜伝染病予防法に則り、ELISA 法や糞便からの菌分離法によってヨーネ病の診断淘汰が実施されてきている。牛ヨーネ病の排菌ルートには糞便中への排出が最も重要なルートであるが、下痢や痩せなどのヨーネ病の症状を示さない不顕性感染牛の一部で、牛乳中に排菌することが知られており、欧米ではこれが10%に至るという報告もある。牛乳や初乳にヨーネ菌が排泄されることは、牛乳が子牛への感染源となることを意味し、家畜衛生上の大きな問題点である。本病の発生は増加し続けているが、海外に比べて我が国の清浄度は高いと考えられている。

一方、ヨーネ病の原因菌であるヨーネ菌

(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)と人のクローン病の病原学的関連についての仮説があり、クローン病患者の腸病変からのヨーネ菌の分離やDNA 検出の論文が多く出されてきている。2004年には米国の加熱殺菌済みの市販牛乳700サンプル中2.8%からヨーネ菌が分離されたという報告がなされ、この事例は、加熱殺菌工程が十分に働かないで、生き残った可能性、もしくは条件によってはヨーネ菌が正式な殺菌条件でも生き残る可能性があることを示唆している。また、2004年にはクローン病患者の半数の末梢血液からのヨーネ菌分離の報告がなされ、本菌がクローン病の直接の原因であるか無いかの結論は別に、人体感染が成立することが強く示唆された。クローン病は厚生労働省により難病疾患に指定されている原因不明の人の炎症性腸疾患であり、家畜伝染病の病原菌との関連性は畜産物の消費を左右しかねない問題である。内閣府食品安全委員会の第2回微生物・ウイルス合同専門調査会(2004年11月)の報告には、家畜伝染病等の廃棄基準の考え方(厚生労働省監視安全課)の資料としてヨーネ病がニパウイルス感染症、結核病やブルセラ病などとともに「ヒトへの病原性が指摘されている疾患」として記載され、「ドイツでは、HIV 患者の男性1名が感染。症状は下痢、発熱、体重の減少。感染源、感染経路は不明。またUK では37名が感染。クローン病の症状(消化器組織に肉芽腫形成、潰瘍、腹痛、無気力、体重の減少、下痢)を示した。うち13名に回腸、10名に結腸、14名に回腸と結腸に病変、15名に肉芽腫形成が見られた。」と人体にヨーネ菌が感染した事を報じている(http://www.fsc.go.jp/senmon/virus/v-dai2/vb2-siryou3-1.pdf)。

また、ヨーネ菌の特徴として上記のように、抵抗性の加熱殺菌抵抗性の菌である事が示唆されているが、本菌の分離培養には通常3ヶ月ほど要し、4～6ヶ月で可視的な細菌コロニーが見られるように超遅発育性の菌であり、通常の菌とは著しく異なっている。このことは防疫推進上の支障となっている。本邦では牛乳中のヨーネ菌の検出および殺菌条件に関する研究はなされておらず、本研究は本菌の新たな生死鑑別・検出方法の検討と、それを基にした殺菌技術の評価を目的とするものである。これらの技術を活用して、加熱殺菌工程のベンチトップ評価を行うべく、温度感作条件を評価する実験系の検討も行ってきた。ヨーネ菌 DNA の検出法についても検討し一定の成果を得たが本稿では、前述した成果報告を中心に述べる。

イ　研究方法

(ア) ヨーネ菌殺菌法の評価を迅速に行うための超生体染色法の検討

carboxyfluorescein diacetate succinimidyl(CFDA)は細胞や一般細菌の生死鑑別やトレーサーとして用いられているが、ヨーネ菌に対する応用はなされておらず、培養に数ヶ月以上要するヨーネ菌の簡易生死判定にこれが使用できれば本菌の殺菌評価研究を進めるために非常に有効である。生きた細胞を染色する技術を超生体染色と呼ぶが、本試薬を用いた超生体蛍光染色法に適した試薬の濃度、染色時間、蛍光強度の検討を、2種類の CFDA 関連試薬を用いて条件検討した。ヨーネ菌には標準株(ATCC 10698)を液体培養(マイコバクチン加 Middlebrook 7H9 liquid medium)により増菌して、-80℃に保存した菌株を用いた。

a　65℃30分加熱処理をしたヨーネ菌(ATCC 10698)浮遊液および無処理対照菌にCFDA(100, 50, 10μM)を加え、超生体染色を実施し蛍光プレートリーダーにて蛍光強度を定量的測定(図2206-1). 菌数は10^8/ml。

b　65℃30分加熱処理をしたヨーネ菌浮遊液および無処理対照菌に CFDA/SE(100, 50, 10μM) を加え、超生体染色を実施し蛍光プレートリーダーにて蛍光強度を定量的測定(図2206-2)。 菌数は10^8/ml。

c　65℃30分加熱処理をしたヨーネ菌加牛乳サンプルと非加熱対照を CFDA にて染色し、スライドガラスに遠心塗沫し(ThermoBioAnalysis, Cytospin4)、蛍光陽性像の観察を行うことで生きたヨーネ菌の残存を確認した(図2206-3)。

d　65℃30分加熱処理をしたヨーネ菌加牛乳サンプルと非加熱対照を CFDA にて染色し毛細管に吸引し、遠心に伴う蛍光陽性菌の分布についても蛍光顕微鏡下およびゲル紫外線ゲル撮影装置下で観察を行った(図2206-3および図2206-4)。

1)　　2)

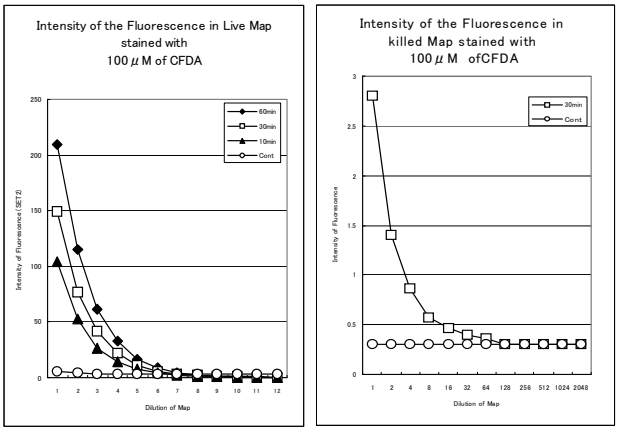


図2206-1　CFDA の染色時間・菌数と蛍光強度変化
1）生菌数と染色後の蛍光強度
2）65℃ 30分加熱後の菌での蛍光強度

1)　　2)

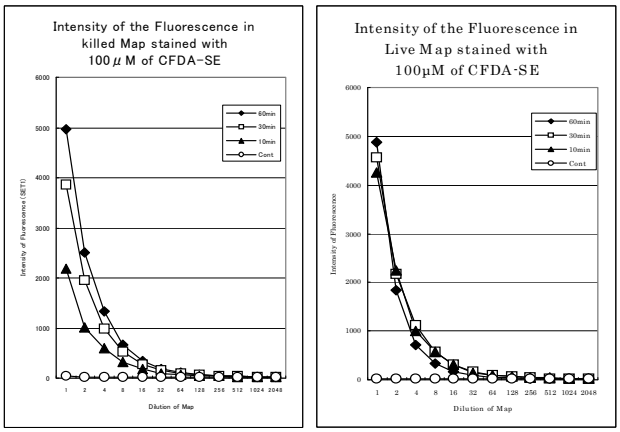


図2206-2　CFDA/SE の染色時間・菌数と蛍光強度変化
1）生菌数と染色後の蛍光強度
2）65℃ 30分加熱後の菌での蛍光強度

1)　　2)

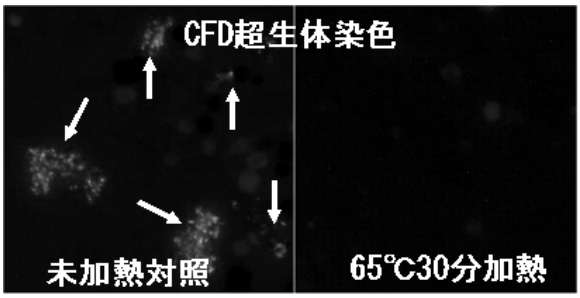


図2206-3　加熱前後の牛乳中の菌の蛍光所見
1）未加熱では集塊状ヨーネ菌が存在（左）
2)加熱後には蛍光陽性菌は見られない（右）

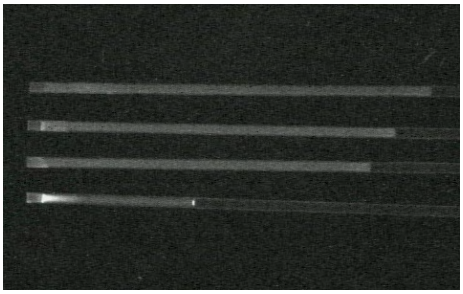


図2206-4　CFDA 加熱菌の遠心後牛乳中の分布
1）毛細管底部（左側）に蛍光陽性菌が分布する。

(ｲ) 牛乳プラントに近い加熱温度条件の再現試験法の評価

牛乳中のヨーネ菌の加熱殺菌条件の評価を行うために、実際の牛乳製造会社の工場における加熱殺菌工程を調査し、加熱時間と温度保持の条件を調査し、その条件に合わせた加熱条件を実験室レベルで再現することを試みた。

a　牛乳工場における加熱プラントの設計と、加熱時間のデータ収集

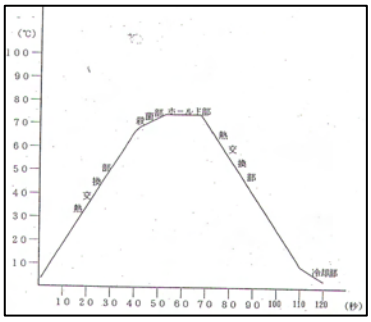
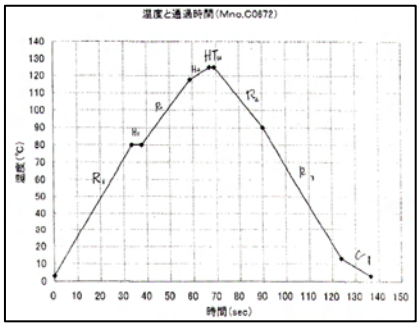
牛乳メーカー 4 社（茨城県内 3 社、千葉県 1 社）の工場における加熱殺菌工程を調査した。

b　デスクトップでの温度管理・測定装置の試作

精密温度制御ヒートブロックとデジタル温度レコーダー(TR-71U)により加熱冷却パターンを再現した。

c　加熱実験用サンプル容器の開発

マイクロスケール実験用に金属チューブを自作し、市販のエッペンドルフチューブとのサンプルの温度変化の差異を比較検討した。(本項目については特許申請準備の関連で詳細は記さない)。

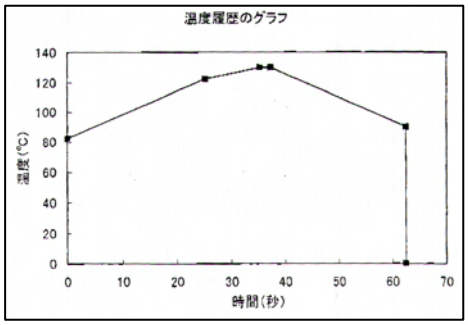
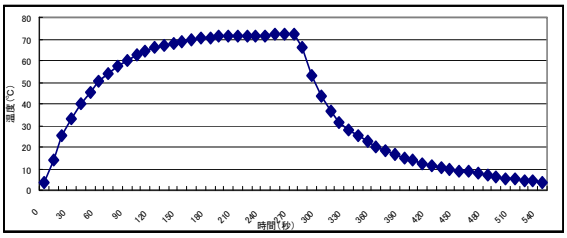


図2206-5　HTST 殺菌機熱履歴72℃15秒間処理（左）、 **図2206-6**　超高温熱処理(UHT) 125℃ 2 秒間処理（中央）、**図2206-7**　超高温熱処理(UHT) 130℃2秒間（右）。



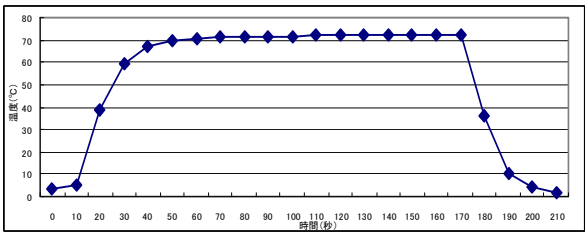


図2206-8　実験容器による牛乳サンプルの実際の加熱経過の違いが示された。1）右図は金属チューブにおける加熱時間とサンプルの温度上昇、下降をデジタル温度計で実測した図。72℃まで50秒ほどで上昇。 2）左図は市販のエッペンドルフチューブ（ポリプロピレン製）での実測値。72℃までの上昇に 4 分間要している。この図では高温保持時間については実際とは異なっている。

ウ　結果　及び　考察

(ｱ) ヨーネ菌殺菌法の評価を迅速に行うための超生体染色法の検討

本研究で得られた CFDA 蛍光試薬を用いたヨーネ菌の生死鑑別技術は 3 ヶ月以上要した従来の培養法の時間を時間単位で明らかにできるように大幅に短縮することができた。また、従来の報告では CFDA 以外に CFDA/SE を細胞や微生物の超生体蛍光染色に用いると報告があるが、CFDA/SE はヨーネ菌の死菌に対しても蛍光染色作用があることが判明して、ヨーネ菌には CFDA 試薬を用いる必要があることがわかった。CFDA 試薬の反応時間や濃度について様々な条件を検討した。50μM 濃度で30分間の感作で、十分な蛍光が得られるという、一般的な使用条件が定められた。この方法により、加熱以外の様々な手段によるヨーネ菌の殺菌・消毒効果の評価を行うことができるようになったことは、本感染症対策の重要な基礎技術開発と評価できる。

(ｲ) 牛乳プラントに近い加熱温度条件の再現試験法の評価

牛乳の殺菌は乳等省令に定められた加熱基準に準じて実際の工場における加熱行程が設定されているが、その時間設定やフローは工場により若干異なっていることがわかった（図2206-5～図2206-7）。IDF（国際酪農連盟）の熱処理法の規格によれば超高温短時間殺菌(UHT)においては120℃～140℃ 2 秒間の加熱が定められている。超高温での加熱は2秒間であるが、実際の殺菌工程では、100℃以上での加熱時間が約1分間位となっており、この条件では通常の微生物は殺滅される。ここに示した実際の処理に置いては予備加熱85℃5-6分があり、間接法と呼ばれる処理法であるが、ヨーネ菌の生残は考えられない事がわかった。一方、パスチュライズド牛乳と呼ばれる方法ではヨーネ菌の生残が起こりうるとの論文もあることから、72℃15秒間の加熱処理の条件をデスクトップ装置で確立することを試みた。この条件ではサンプル温度が約40～50秒で72度に到達する必要があり、結果に示したように、通常のポリプロピレン製のエッペンドルフチューブでは、72℃までに 4 分以上要しこれが不可能であることがわかった。そのため、より熱伝導率の良い金属容器でこれを行ったところ、ほぼ実際の工場の加熱条件と同様の温度上

昇ないし下降の時間が得られることがわかった（図2206-8)。この金属容器については、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構より特許出願の準備中である。

エ　今後の課題

(ｱ) ヨーネ菌殺菌法の評価を迅速に行うための超生体染色法の検討

本技術は培養法と比較して、極短時間でヨーネ菌の生死が判断できることから、菌の生残や殺菌条件の検討を短時間に行う様々な実験系や研究に応用ができバッチ法や連続殺菌法の様々な条件評価に使用して実用性を示していく必要がある。

(ｲ) 牛乳プラントに近い加熱温度条件の再現試験法の評価

これまでの研究のため、いくつかの乳業会社が、加熱殺菌プラントの実際の温度勾配や加熱時間加熱法のデータを提供してくれたが、他の乳製品製造過程での加熱温度条件の再現をさらに確認して氷解していく必要がある。また、初乳の簡易加熱装置については最近市販品が出ているが、これらの殺菌条件についても評価していく必要がある。温度以外の感作する要素を加えた殺菌法の検討も望まれるため、この系を用いて評価していく。

オ　要　約

(ｱ) ヨーネ菌殺菌法の評価を迅速に行うための超生体染色法の検討

ヨーネ菌の生死鑑別は殺菌装置や殺菌条件の評価をするために必須の課程であるが、従来法では培養に3ヶ月以上要すという困難さがあったが、本研究により CFDA 蛍光試薬を用いることで、数時間でこれを行うことができるようになった。この技術により、ヨーネ菌の殺菌法の研究が加速された。

(ｲ) 牛乳プラントに近い加熱温度条件の再現試験法の評価

従来の牛乳の加熱殺菌条件ではヨーネ菌が生残するという可能性が示されてきたため、再現性良く加熱殺菌する条件や研究ニーズがあった。これに対し本研究ではコンピュータ制御、デジタル温度計と加熱金属ブロックの組み合わせにより、温度コントロールとモニタリングを実施し、さらに牛乳サンプルを入れる容器について、評価を行い、ポリプロピレン性ではなく温度応答性の良い小型金属容器を開発した。

カ　引用文献

1) Aodongeril ら 2004 Evaluation of fluorescence labeling for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by CFDA/SE and CFDA. 第161回日仏生物学会抄録（2004/5/29）

2) Fuller ME et. al. 2004 Application of a vital fluorescent staining method for simultaneous, near-real-time concentration monitoring of two bacterial strains in an Atlantic coastal plain aquifer in Oyster, Virginia. Appl Environ Microbiol. 70:1680-1687.

3) Lund BM, 2002 Pasteurization of milk and the heat resistance of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: a critical review of the data. 1: Int J Food Microbiol. 25:135-145.

4) McDonald WL et. Al. 2005 Heat inactivation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk. Appl Environ Microbiol. 71:1785-1789.

5) 百溪英一、2001 ヨーネ病と人間のクローン病の関係について　臨床獣医　19: 45-61.

6) 百溪英一ら 2004 染色試薬 carboxyfluorescein diacetate succinimidyl (CFDA) および同 succinimidyl estere (CFDA/SE) を用いたヨーネ菌の簡易生死判定と蛍光ラベル法 2005 平成16年度 動物衛生研究成果情報 No. 4 p33-35.

7) Stabel JR. 2000 Johne's disease and milk: do consumers need to worry? 1: J Dairy Sci. 83:1659-1663

8) Stabel JR et. al. 2004 Efficacy of pasteurization conditions for the inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. J Food Prot. 67:2719-2726.

9) Urbani S et. al. 2006 Use of CFDA-SE for evaluating the in vitro proliferation pattern of human mesenchymal stem cells. Cytotherapy. 8:243-253.

研究担当者（百溪英一*、オドンゲリル）

7　表面温度測定による食品中の汚染微生物増殖予測システムの開発

ア　研究目的

食品は製造後、保管、輸送など諸過程を経て消費者に渡り、消費者もそれを家庭内で保存することが多い。このような製造から消費に至る各過程で食品の温度は当然一定ではない。特に夏期は輸送・保管中も品温が上昇し、生鮮食品中の有害汚染微生物の増殖が危惧される。したがって、変動温度下における微生物増殖予測モデルを開発することによって、食品の受けた温度履歴から有害微生物増殖を未然に知り、それらによる食中毒、腐敗の発生を予防する。さらに、その増殖予測モデルを組み込んだ、食品摂取による食中毒あるいは食品自体の腐敗発生を予測し、警告を示すアラートシステムの開発を検討する。

イ　研究方法

(ｱ) 変動温度下における大腸菌増殖予測モデルの開発

最近私たちの開発した新ロジスティックモデルを用いて変動温度下の大腸菌増殖を予測できるかを検討した(Fujikawa et al. 2003)。すなわち、定常温度において普通ブロス培地中で大腸菌を培養し、一定時間ごとに試料中の生菌数を寒天平板表面塗沫法を用いて測定した。得られたデータを新モデルを用いて解析し、モデルの各係数値を求めた。それらの値を用いて実測温度から大腸菌増殖を予測し、その予測した菌数と実測値とを比較・検討した。

(ｲ) 牛乳中における黄色ブドウ球菌増殖およびエンテロトキシン産生予測

市販牛乳中に、食中毒事件由来エンテロトキシンA(SEA)産生ブドウ球菌を接種し、定常および変動温度下で保存した。一定時間ごとに試料を取り出し、その菌数と毒素量を寒天平板表面塗沫法とバイダスエンテロトキシン検出キットを用いて測定した。また、これまでのモデルの一部を改良し、世界的によく知られているバラニーモデルと比較した(Baranyi and Roberts. 1994.)。

(ｳ) 食品表面上での増殖予測と微生物増殖予測システムの開発

栄養寒天表面に大腸菌を塗抹し、一定時間ごとに菌数を測定した。温度は一定および変動下で検討した。さらに、食品内の熱伝導式を基に、食品の表面温度から各部位の温度を推定し、その温度から対象微生物の増殖予測を行うアラートシステムの開発を検討した。

ウ　研究結果

(ｱ) 変動温度下における大腸菌増殖予測モデルの開発

定常温度の液体培地中で培養した大腸菌増殖曲線を、新たに開発したモデルは高い精度で表した。その例を図 2207-1に示す。次に、各温度での本モデルの係数値を解析した結果、各温度での増殖速度定数は平方根モデルで高い直線性を示し（図2207-2)、その他の調整係数は温度によらず、ほぼ一定であった。

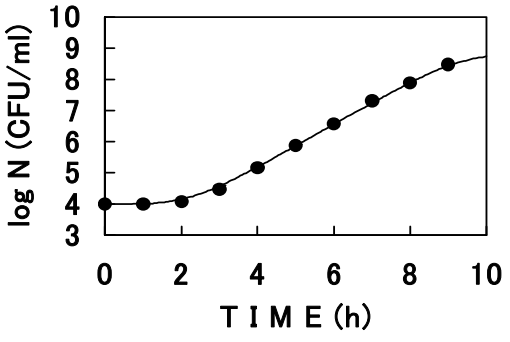


図2207-1　定常温度下での大腸菌増殖（30℃）実線はモデルによる増殖曲線、黒丸は実測値を表わす。

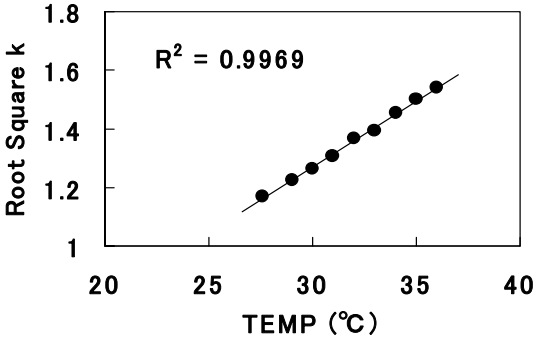


図2207-2　各温度における増殖速度定数
黒丸は実測値、直線は回帰直線を表わす。
数字は相関係数を示す。

以上の解析結果を用い、変動温度下での大腸菌増殖を本モデルを使って予測した。その結果、図2207-3に示すように予測値と実測値との間に非常に良い一致が認められた(Fujikawa et al. 2004a)。その他の変動温度パターンにおいても同様な結果が得られた。

(イ) 牛乳中における黄色ブドウ球菌増殖およびエンテロトキシン産生予測

各種定常温度(14-36.5℃)の牛乳中でのブドウ球菌増殖曲線を、新たに改良したモデル II は高い精度で表した(Fujikawa et al. 2004b, Fujikawa and Morozumi. 2006)。その例を図4に示す。モデルIに比べてモデルIIはバラニーモデルBARと同様、対数初期の直線的増殖を高い精度で表すことができた。また、増殖速度定数およびラグタイムにおいてモデルIIはバラニーよりもやや実測値に近い値を示した。以上の結果から、モデル II は非常に高い精度で本菌の増加挙動を表すことが示された。

毒素は生菌数が約$10^{6.5}$CFU/ML に達した時点から直線的に増加した（図2207-4)。この結果はその他の温度でも認められた。毒素産生曲線の傾きからその産生速度定数を求めた。これらの結果から、本菌の毒素産生量を各温度における産生速度定数から予測する毒素産生予測モデルを作成した。

各種の変動温度パターンについて検討した結果、非常に高い精度で本菌の増殖挙動を予測できた。さらに、毒素産生量においても高い精度で予測できた。その例を図2207-5に示す。

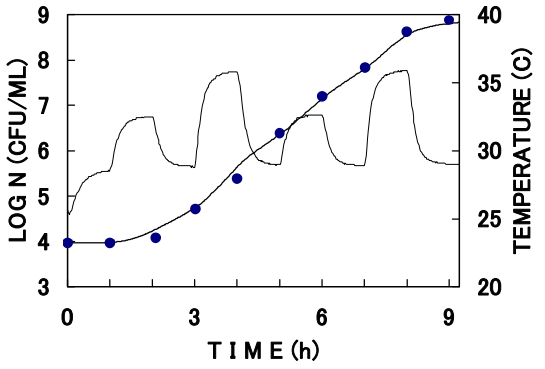


図2207-3 変動温度下での大腸菌増殖予測
実線はモデルによる増殖曲線、周期的な実線は実測温度を表わす。黒丸は実測値を示す。

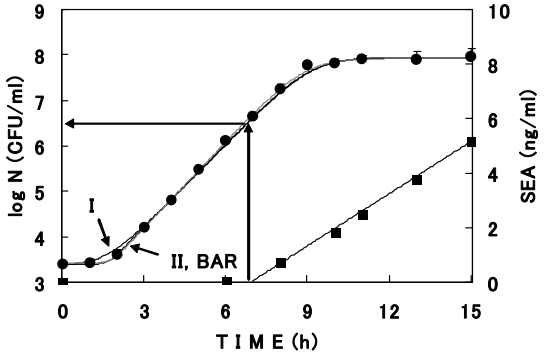


図2207-4 定常温度下での黄色ブドウ球菌の増殖とエンテロトキシン産生量（32℃).
実線（曲線）は各モデルによる増殖曲線、実線（直線）は回帰直線、●は実測した生菌数（平均値)、■は毒素濃度を表わす。バーは標準偏差を示す。矢印は回帰直線から毒素が検出される開始点を示す。

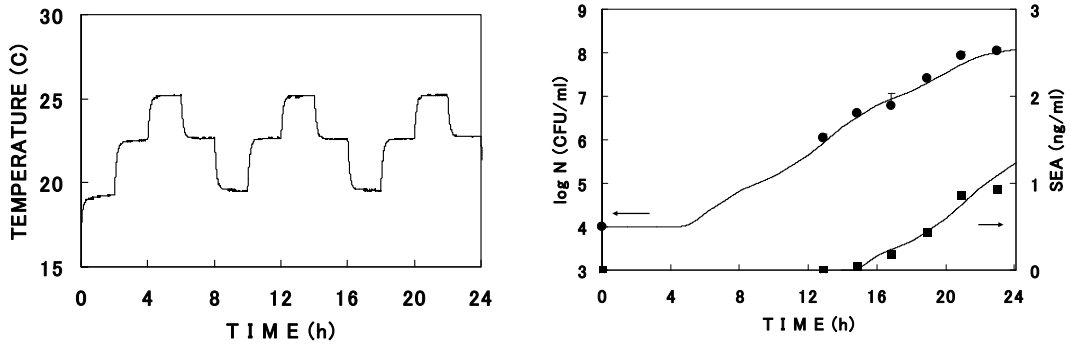


図2207-5 変動温度下での黄色ブドウ球菌の増殖とエンテロトキシン産生量予測
左図の温度条件下での菌数および毒素量を予測した。記号は図2207-4参照。

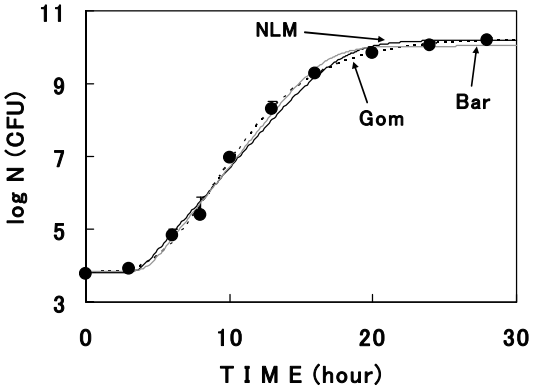


図2207-6　寒天平板表面上での大腸菌増殖（26℃）

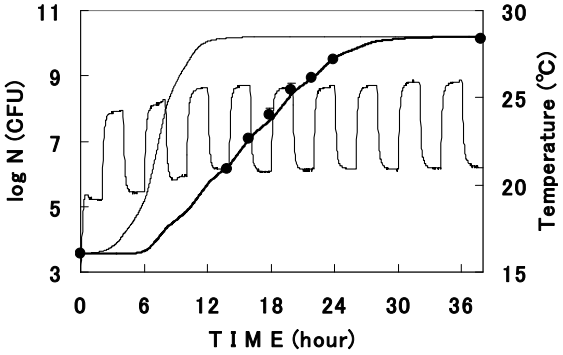


図2207-7　変動温度下の寒天平板表面上での大腸菌増殖予測．温度は周期的細線。太線は NLM を、細線は Bar を示す。

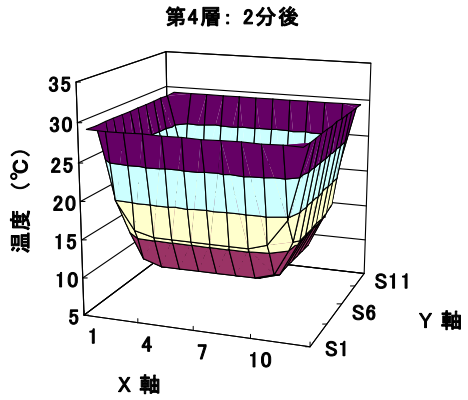


図2207-8　牛肉パテの推定温度分布曲線

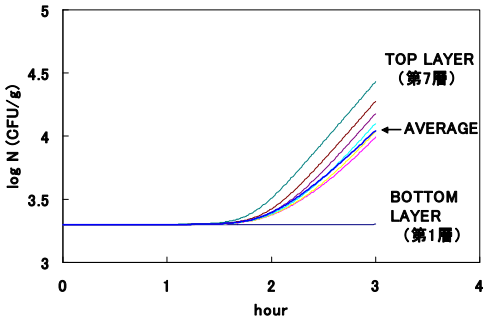


図2207-9　牛肉パテ各層での増殖予測

(ウ) 食品表面上での増殖予測と微生物増殖予測システムの開発

定常温度における栄養寒天表面平板上の大腸菌増殖を新モデル NLM は高い精度で表せた(図2207-6)(Fujikawa and Morozumi. 2005)。国際的に良く知られたバラニーモデル Bar、ゴンペルツモデル Gom による曲線もよく一致した(図2207-6)。そのデータを基に変動温度での大腸菌の表面増殖を予測した結果、高い精度で予測できた。一方、バラニーモデルでは異常に速い予測を示した(図2207-7)。なお、ゴンペルツモデルは変動温度に対応できない(Gibson et al. 1987)。

食品の温度はその部位および時刻によって変化し、その温度に従って汚染微生物は増殖する。そこで、食品内の熱伝導を解析し、表面温度から食品各部位の温度を推定するプログラムを作成した。例として10℃に保存した牛肉パテ(60x60x35mm)を35℃の環境に置いた場合の 2 分後の水平断面（全 7 層中第 4 層）での予測温度分布を示す（図2207-8)。食品内部ほど温度が低いことが分かる。さらに、このプログラムと増殖予測プログラムを組み合わせたシステムを開発した（図2207-9)。ここでは上記パテの大腸菌（初期汚染量2000CFU/g）の各水平層および全体（平均）での予測増殖挙動（ 3 時間）を示す。

工　考　察

(ア) 変動温度下での黄色ブドウ球菌エンテロトキシン産生量は予測値に対してどの測定時間でも低い値であったため、調整係数を導入した。その結果、図2207-5に示すよう
に良い予測ができた。この原因を今後検討する必要があろう。

(イ) 今回以外の実験で、食品内部の大腸菌増殖は

液体中、固体表面上での増殖と同じ温度では同一の挙動を示した。これらの結果から、栄養が十分ある環境では細菌の増殖はその汚染部位に係わらず一定で、温度に大きく依存すると考えられる。

オ　今後の課題

(ｱ) 本増殖モデルがどのような温度条件（温度帯、変化速度など）にまで適用できるか検討する必要がある。

(ｲ) 多種の微生物汚染がみられる実際の食品中における増殖予測がどこまで可能かを検討する必要がある。

(ｳ) 実際の食品の温度変化を測定し、温度推定手法を確立する必要がある。

カ　要　約

(ｱ) 最近開発した増殖モデルの有効性を各種温度条件(定常・変動)および環境条件（液体、固体表面など）でその有用性を検討した。その結果、本モデルは精度の非常に高い増殖予測ができた。また、微生物の代謝産物（ブドウ球菌毒素）の生成量においても同様であった。

(ｲ) 本増殖モデルを用い、食品内の熱伝導式を基に汚染微生物の増殖予測を行うアラートシステムの開発をした。このシステムは、食品の表面温度から内部の汚染微生物増殖を予測する道具として、今後食品衛生上大いに役立つと考えられる。

キ　引用文献

1) Baranyi, J., and T. A. Roberts. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int. J. Food Microbiol. 23:277-294.

2) Fujikawa, H., A. Kai, and S. Morozumi. 2003. A New Logistic Model for Bacterial Growth. Journal of the Food Hygienics Society of Japan. 44 (3):155-160.

3) H. Fujikawa, A. Kai, and S. Morozumi. 2004a. A New Logistic Model for *Escherichia coli* Growth at Constant and Dynamic Temperatures. Food Microbiology. 21:501-509.

4) Fujikawa, H., A. Kai, and S. Morozumi. 2004b. Improvement of New Logistic Model for Bacterial Growth. Journal of the Food Hygienics Society of Japan. 45 (5):250-254.

5) Fujikawa, H. and S. Morozumi. 2006. Modeling *Staphylococcus aureus* Growth and Enterotoxin Production in Milk. Food Microbiology. 23:260-267.

6) Gibson, A. M., N. Bratchell, T. A. Roberts. 1987. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. J. Appl. Bacteriol. 62:479-490.

研究担当者（藤川　浩*、矢野一好、諸角　聖）

第３章　食品衛生管理のための有害微生物制御技術の高度化

１　農産物加害細菌の汚染・付着防止技術の開発

ア　研究目的

サルモネラ菌等の食中毒細菌による健康危害が国民の食生活に不安を与えている。特に、野菜、果実など生食を基本とする食品の安全性確保（Beuchat、2002）を達成するためには、食中毒細菌の非加熱殺菌・除菌法の開発が必要であるとともに、食品への再付着防止技術の開発も重要となる。本研究では、食品表面を処理することにより食中毒細菌による汚染や付着を予防できる食品成分や既存・天然添加物を表面プラズモン共鳴（SPR）バイオセンサーを用いて検索し、生食用食品の汚染防止・除去法を開発するとともに細菌付着機構の解明を行う。また、低い有効塩素濃度で次亜塩素酸ソーダと同程度の殺菌効果が期待される「微酸性次亜塩素酸水」による効果的な青果物の殺菌洗浄法を構築する。

イ　研究方法

（ｱ）SPR 法により、*S.* Enteritidis 菌体とコラーゲンの結合を阻害する物質を検索した（Miyamoto、2003）。SPR センサー素子を装着したフローセルに *S.* Enteritidis 菌懸濁液を流速0.1ml/min で流して、センサー素子金薄膜上に菌体を吸着させた。PBS 洗浄後、試験溶液、PBS、0.1mg/ml コラーゲン、PBS、同一試験溶液、PBS の順に流して屈折率を記録した。同様にセンサー素子上に菌体を吸着させ、PBS で洗浄した後、0.1％試験溶液および0.1mg/ml コラーゲン混合液、PBS の順に流して屈折率を経時的に記録した。

（ｲ）牛肉へのサルモネラの付着阻害を調べるために、試験溶液（0.1％水溶液）に浸して５分間処理した牛肉を *S.* Enteritidis 菌液（約10^9cfu/ml）に５分間浸して菌を付着させた後、再び新鮮な試験溶液（0.1％水溶液）中で洗浄した。PBS で２回十分に洗浄後、PBS 中で破砕し、生菌数を測定した。試験溶液の代わりに PBS を用いたものを対照区とした。

付着阻害率（％）＝[（対照区の生菌数）−（試験区の生菌数）]×100÷（対照区の生菌数）

（ｳ）セルロース合成酵素遺伝子破壊株作製のために、Solano ら（2002）の方法を参考にして pKOBEGA 導入 *S.* Enteritidis を用いて植物表面への付着に関与すると考えられるセルロース合成酵素をコードする bacteria cellulose synthesis A 遺伝子（*bcsA*）の破壊株（Δ*bcsA*）を作製した。この破壊株と野生株について野菜表面への付着状態を蛍光顕微鏡観察により比較検討した。

（ｴ）微酸性次亜塩素酸水（Slightly Acidic Hypochlorous Water、SAHW）の各種細菌に対する殺菌効果を調べ、生食用野菜の微生物制御への応用について検討した。

ウ　研究結果

（ｱ）既存添加物20種、天然添加物および抽出物37種、天然色素17種についてスクリーニング試験した結果、グリセリン脂肪酸エステル類、ヘキサメタリン酸塩、アルギン酸、プロタミン、アントシアニン、唐辛子抽出物、ワサビ抽出物、クルクミン、４種の天然色素製剤などでサルモネラ菌体とコラーゲンの結合阻害が認められた（表2301-1）（Miyamoto ら、2003）。

（ｲ）結合阻害効果の認められたものについて牛肉へのサルモネラ菌付着に対する阻害効果を一部調べた結果、アナトー色素製剤、紫芋色素製剤、クチナシ色素製剤、唐辛子抽出物、プロタミン、モノグリセリンラウリル酸エステル、ヘキサメタリン酸塩、アルギン酸塩について阻害効果が認められた（表2301-2）。また、これら添加物とサルモネラ菌を含有した水中で発芽させるとカイワレの表面へのサルモネラの付着も低減化した。

（ｳ）*S.* Enteritidis の相同組み換えにより得られた数個のカナマイシン耐性のコロニーについて PCR、ゲノミックサザン解析により調べた結果、一株の *bcsA* 破壊株が得られた。得られた遺伝子破壊株に緑色蛍光タンパク質発現ベクターを導入した *S.* Enteritidis（SE-EGFP：Δ*bcsA*）を作製した。グルコース存在下で、キャベツ、ガラス、プラスチック上でインキュベートして菌体の付着を観察した結果、野生株に比べて破壊株 SE-EGFP：Δ*bcsA* では菌体の付着量が大きく低下した（図2301-1）。

表2301-1　*S.* Enteritidis 固定化センサーへの添加物、コラーゲンおよび添加物の順次添加による付着

食品添加物	RI 値 (X 10^{-6}) の変化		
	添加物	コラーゲン	添加物
Control	−	817	−
0.1% Na hexametaphosphate	−14	633	−29
1.0% Na citrate	−71	907	−66
1.0% mannose	−1	705	16
0.1% Na alginate	−15	640	−11
0.1% Monoglycerol monocaprylate	256	413	−475
0.1% Monoglycerol monocaprate	38	621	−229
0.1% Monoglycerol monolaurate	351	430	−152
0.1% Monoglycerol monomyristate	−103	826	−93
0.1% Diglycerol monocaprylate	−110	949	−25
0.1% Diglycerol monocaprate	−353	136	289
0.1% Diglycerol monolaurate	17	439	−158
0.1% Diglycerol monomyristate	64	311	−490
0.1% Sorbitan monocaprylate	80	343	−70
0.1% Lyso-lecitin	25	507	−25
0.1% Protamine	1510	−738	0
0.1% Anthocyanin	149	374	−113
0.1% Pectin hydrolysate	547	127	16
0.1% Japanese horseradish extract	158	−150	24
1.0% Malt extract	466	238	−13
1.0% Tomato extract	−153	634	−36
1.0% Soybean germ extract	−32	365	−13
1.0% Nutmeg extract	−36	1174	−102
1.0% Parsley extract	17	521	−6
1.0% Chili extract	−27	427	−3
1.0% Kiwifruit extract	−31	714	−41
1.0% Grapefruit	−109	949	−165
1.0% Peach extract	−185	489	−189
1.0% Mango extract	−3	206	−135
1.0% Lime extract	4	925	−107
1.0% Concentrated tomato juice	239	228	45
1.0% San-red MR	93	179	408
1.0% San-red YM	45	22	66
1.0% San-red RCFU	235	327	122
1.0% San-yellow No. 2AU	12	126	84
1.0% San-yellow No. 3L	−128	−297	−114
1.0% Purple corn extract	351	110	298
1.0% Annatto AN	−458	−231	61
1.0% Curcumin	2435	−65	1323

表2301-2　牛肉への *S.* Enteritidis の付着に及ぼす添加物処理および洗浄の影響

食品添加物(0.1%)	阻害率(%)
Na hexametaphosphate	55.1
Na alginate	68.1
Monoglycerol monocaprylate	0
Monoglycerol monolaurate	64.9
Diglycerol monomyristate	7.8
Protamine	99.8
Chili extract	55.2
Japanese horseradish extract	45.9
San-red MR	0
San-red YM	11.7
San-yellow No.3L	54.0
Annatto AN	87.0

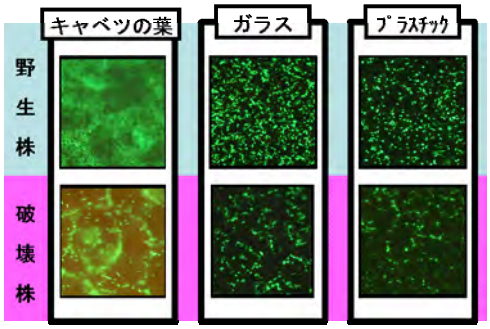


図2301-1　*S.* Enteritidis 野生株およびセルロース合成酵素遺伝子破壊株の物質表面への付着性

(ｴ) SAHW 処理直後の生菌数測定結果から、最少発育阻止有効塩素濃度は *B. cereus* および *S. aureus* では30ppm、*S.* Enteritidis、*E. coli* O157:H 7 及び K-12、*L. monocytogenes* では 5 ppm であった(表2301-3)。SE に対する殺菌効果を NaClO、H_2O_2と比較した結果、NaClO 同様、処理直後に生菌数が低下し、速効性であった (図2301-2)。次に、市販レタスのマイクロフローラを解析した結果、*Flavobacterium* 又は *Xanthomonas* 属細菌が82%、*Pseudomonas* 属細菌が12%、腸内細菌科の細菌が0.1%、これら以外に *Micrococcus* 属、*Kurthia* 属および *Corynebacterium* 属細菌などが検出された。SAHW は、分離した *Flavobacterium*・*Xanthomonas* 属細菌株に対して有効塩素濃度30ppm で、*Pseudomonas* 属細菌株には10ppm、*Kurthia* 属細菌株には 5 ppm、*Corynebacterium* 属細菌株及び *Micrococcus* 属細菌株には 1 ppm で殺菌効果を示した。このレタスを有効塩素濃度30ppm で 5 分間 SAHW 処理しても生菌数はほとんど低下しなかった。しかし250ppm ショ糖ステアリン酸エステルとの併用により生菌数は約 1 桁低下した。モノエステル含量の高いものが併用効果が若干高かったが、10℃で 5 日間貯蔵後には大きく増加し (図2301-3)、褐変も観察された。また、50℃で30ppm SAHW 処理を 5 分間行った結果、生菌数は約 2 桁低下し、10℃、 5 日間後も生菌数は増加せず、褐変も認められなかった (図2301-4)。

表2301-3　SAHW の抗菌スペクトル

細菌		生菌数 (CFU/ml)				
		処理前	SAHW 処理後			
			1.0 ppm	5.0 ppm	10 ppm	30 ppm
B. cereus	JCM 2152	1.3×10^{7}	5.6×10^{6}	1.1×10^{4}	9.7×10^{3}	1.0×10^{2}
	嘔吐株	1.7×10^{7}	1.0×10^{4}	5.5×10^{3}	1.7×10^{3}	0
	下痢株	1.4×10^{7}	1.4×10^{4}	1.5×10^{3}	1.2×10^{3}	6.0×10^{1}
S. aureus		7.0×10^{7}	3.1×10^{5}	6.6×10^{4}	9.4×10^{2}	0
S. Enteritidis		1.4×10^{8}	1.1×10^{6}	0	0	0
E. coli	IFO 3301	4.1×10^{7}	2.2×10^{3}	6.0×10^{1}	0	0
	O157:H7	3.6×10^{7}	1.0×10^{3}	0	0	0
L. monocytogenes	1/2a	4.6×10^{7}	3.5×10^{2}	0	0	0
	4b	1.6×10^{8}	2.1×10^{3}	0	0	0

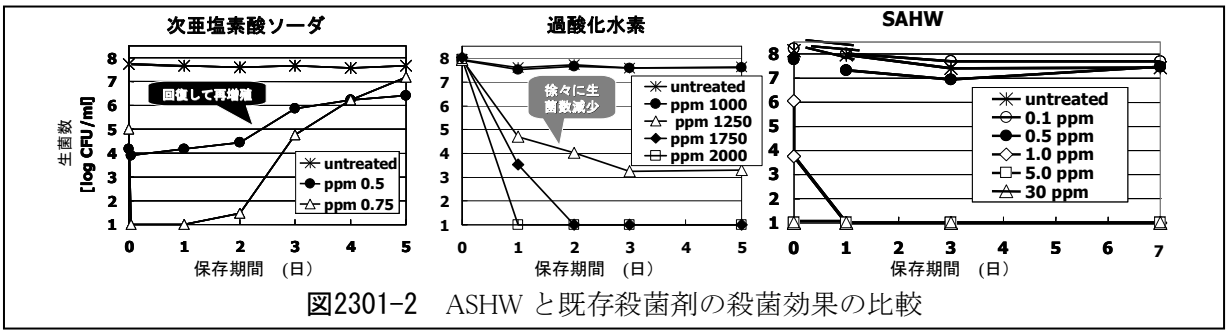


図2301-2　ASHW と既存殺菌剤の殺菌効果の比較

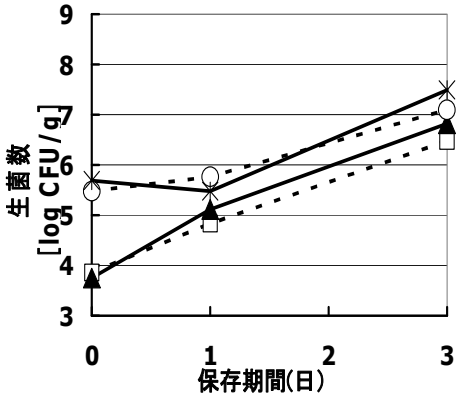


図2301-3　SAHW とショ糖脂肪酸エステルの併用効果

×：コントロール、○：30ppmSAHW のみで処理、▲：250ppm ショ糖ステアリン酸エステル（ﾓﾉｴｽﾃﾙ含量：45％）と30ppmSAHW の併用、□：250ppm ショ糖ステアリン酸エステル（ﾓﾉｴｽﾃﾙ含量：70％）と30ppmSAHW の併用

エ　考　察

（ｱ）グリセリン脂肪酸エステルにおいて、その脂肪酸側鎖が長いほど、疎水性領域が増大するほど、コラーゲンとの親和性が高くなっていることなどから、菌体とコラーゲン、食品添加物の相互作用には、疎水性領域と親水性領域の存在による疎水性相互作用および静電的な相互作用が関与していることが考えられた。

（ｲ）塩基性たんぱく質、酸性多糖、両親媒性化合物、疎水性残基を持つポリエン化合物はコラーゲンを介したサルモネラと肉との結合を阻害すると考えられた。これらの結果は、酸性多糖であるカラギーナンが細菌とコラーゲンとの結合阻害を示した Medina ら(2001)の報告とも一部一致した。

（ｳ）細菌が付着することで、金属、ガラスまたはゴム表面でバイオフィルムを形成する（Hood ら、1997；Sommer ら、1999；Chae ら、2000）ことが知られている。バイオフィルムの主要成分の一つであるセルロース合成に関与しているセルロース合成酵素触媒サブユニットをコードする *bcsA* に注目し、*S.* Enteritidis の *bcsA* 破壊株を作製し、その付着挙動を野生株と比較した結果、破壊株の野菜、ガラス、プラスチックへの付着は野生株に比べ低下したが、完全に付着しなくなるわけでは無かった。セルロースの他、細菌の繊毛も付着に関与するので（Austin ら、1998）、繊毛欠損株を作製して、付着挙動を調べる必要があると思われる。

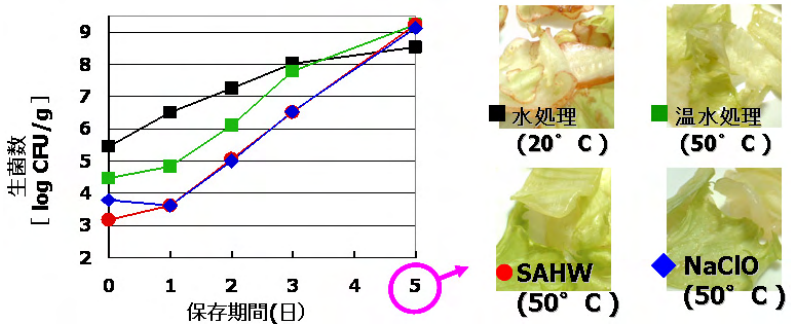


図2301-4　50℃における SAHW の殺菌効果

(ｴ) 微酸性次亜塩素酸水の殺菌効果を代表的な食中毒細菌、レタスから分離した細菌に対して純培養系で調べた結果、試験した細菌株に対しては有効塩素濃度5.0ppm 以上で静菌効果が、30ppm で即効性の殺菌効果も認められた。従って、30ppm の微酸性次亜塩素酸水は、夾雑物を含まない純粋培養系では、十分な殺菌効果を示すことが明らかとなった。しかし、細菌芽胞に対する効果や有機物存在下での殺菌効果について、さらに検討が必要と考えられる。また、微酸性次亜塩素酸水と種々の界面活性剤との併用効果を調べた結果、ショ糖ステアリン酸エステルとの併用効果が認められた。野菜の洗浄においてショ糖脂肪酸エステル類の中ではラウリン酸エステルの洗浄効果が大きいことが報告されており（鍛冶、2005)、今後、ショ糖ラウリン酸エステルと微酸性次亜塩素酸水との併用効果について検討する必要がある。また、50℃での微酸性次亜塩素酸水処理は、常温処理に比べて殺菌効果も 1 桁高く、処理後のレタスを10℃保存中に褐変も認められなかったことから、有効な殺菌法と考えられた。

オ　今後の課題

(ｱ) セルロース以外に繊毛成分も細菌の固体表面への付着に関係しており、さらにこのサルモネラ菌破壊株を作成して付着機構を明らかにする。

(ｲ) サルモネラ菌のセルロース合成酵素破壊株および繊毛合成遺伝子破壊株それぞれについて、固体表面との付着を阻害する天然物のスクリーニングを行う。

(ｳ) それぞれの破壊株の固体表面への付着を阻害する化合物を組み合わせて、より効果的な細菌付着防止法の構築を行う。

(ｴ) 50℃における微酸性次亜塩素酸水処理と種々のショ糖エステル類との併用効果を明らかにする。また、微酸性次亜塩素酸水処理における最適温度条件および界面活性剤との併用効果、マイクロバブルとの併用効果などを調べて実用性の高い「生食用野菜類の有害細菌殺菌・除去技術」を確立する計画である。

カ　要　約

(ｱ) 塩基性たんぱく質、酸性多糖、両親媒性化合物、疎水性残基を持つポリエン化合物は、サルモネラ菌とコラーゲンとの結合を阻害した。

(ｲ) アナトー色素製剤、紫芋色素製剤、クチナシ色素製剤、唐辛子抽出物、プロタミン、モノグリセリンラウリル酸エステル、ヘキサメタリン酸塩、アルギン酸塩はサルモネラ菌の牛肉への付着を実際に阻害した。

(ｳ) セルロース合成酵素遺伝子破壊株に緑色蛍光タンパク質発現ベクターを導入した *S.* Enteritidis（SE-EGFP: Δ*bcsA*）を作製した。グルコース存在下で、キャベツ、ガラス、プラスチック上でインキュベートして菌体の付着を観察した結果、野生株に比べて破壊株 SE-EGFP: Δ*bcsA* では菌体の付着量は大きく低下した。

(ｴ) 微酸性次亜塩素酸水の殺菌効果を代表的な食中毒細菌、レタスから分離した細菌に対して純培養系で調べた結果、有効塩素濃度30ppm で即効性の殺菌効果が認められた。また、微酸性次亜塩素酸水と種々の界面活性剤との併用効果を調べた結果、SAHW とショ糖ステアリン酸エステルとの併用効果が認められた。

キ　引用文献

Austin, J. W. et al. 1998 Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 162: 295-301.

Chae, M. S. and Schraft, H. 2000 Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology* 62: 103-111.

Hood, S. K. and Zottola, E. A. 1997 Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology* 37: 145-153.

鍛冶　孝　2005　食品用乳化剤の基礎と応用　防菌防黴 33(7):365-372.

Medina, M.B., 2001 Binding of Collagen I to *Escherichia coli* O157:H 7 and Inhibition by Carrageenans, Int. J. Food Micribiol. 69: 199-208

Miyamoto T, et al. 2003 Studies on collagen binding with immobilized *Salmonella* Enteritidis and inhibition with synthetic and naturally occurring food additives by a surface plasmon resonance biosensor. Sensors and Materials, 15(8):453-466.

Solano, C., et al. 2002 Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol.* 43: 793-808.

Sommer, P. et al. 1999 Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. *Food Microbiology* 16: 503- 515.

研究担当者（宮本敬久*）

2　新規食用微生物による「浅漬け」食品中の微生物制御

ア　研究目的

1996年に堺市で発生した病原大腸菌O157集団感染事件以来、野菜が細菌性食中毒の原因になりえることは、多くの人の認知するところとなった。近年では「浅漬け類」を原因食材とする病原大腸菌食中毒事件の発生という問題も発生している。著者らの研究により、一度浅漬け中に混入した食中毒原因菌は、賞味期間内に容易には死滅しないことが示されている[2)]。そのため、この種の食品の食中毒リスクを下げるためには、洗浄殺菌により原料の病原菌汚染レベルを下げるとともに、食品添加物の使用により最終商品中の食中毒原因菌の増殖を抑制、減少を図ることが必要である。

生食用野菜の洗浄殺菌には次亜塩素酸ナトリウムが多用されるが、この物質には、容易に食品中の有機物と反応して活性を失い、その時に発ガン性が疑われる有機塩素化合物を生成するなどの問題がある。亜塩素酸ナトリウムをpH 3 以下の酸と混合して作成した「酸性化亜塩素酸」（ASC）水は、このような問題が少ない殺菌剤である。生食用野菜加工食品の殺菌目的で亜塩素酸ナトリウムを使用することは食品衛生法上、認められており、また米国FDAによる安全性審査により、その安全性も確認されている。生食用野菜類の表面殺菌にASC水を用いた研究例はそれほど多くないことから、漬物原料野菜に付着した食中毒原因微生物に対するASC水の効果につき検討を行った。

適切な食品添加物の使用は食品の安全性確保の観点からは有益であると考えられるが、近年の消費者の「自然・天然」志向もあって、食品への合成添加物の使用は避けられる傾向がある。そこで浅漬け製品に混入した食中毒原因微生物に対する、天然添加物の効果につき検討を行った。さらにバイオプリザベーションの目的として使用可能な、新規抗菌性納豆菌の分離を行い、これを浅漬けの微生物制御に応用した。

イ　研究方法

(ｱ) ASC の葉もの野菜に付着した病原大腸菌に対する洗浄殺菌作用[1)3)]

約3×3cmに切りそろえた市販白菜表面にリファンピシン耐性病原性大腸菌 O157:H7 4株を付着させ、その洗浄殺菌力について検討を行った。洗浄は100gの白菜に対して1000ml の洗浄液を用い、ガラス棒で攪拌しながら15分間行った。検体中の病原大腸菌生菌数をリファンピシン添加トリプティケースソイ寒天（TSB-Rif）あるいはリファンピシン添加ソルビットマッコンキー寒天（SMAC-Rif）を用いて計数した。

(ｲ) ASC 洗浄処理の浅漬け微生物制御への応用[4)]

市販白菜500g を切断し、ASC 水あるいは蒸留水で洗浄した。病原菌接種試験においてはリファンピシン耐性を付与した病原大腸菌 O157:H7株、サルモネラエンテリティディス、黄色ブドウ球菌およびリステリアモノサイトゲネスについて、それぞれ3-4菌株の混合液に原料白菜を浸けた後、無菌的に20分間乾燥させたものを原料として使用した。殺菌ビニールバッグに白菜を移し、呼び水（塩濃度3.0%）150ml、食塩15g、グルタミン酸ナトリウム1.5g を添加後、5kgの重石を乗せて10℃で漬け込みを行った。一定時間後に25g をサンプリングし、定法により生菌数を測定した。また官能検査などの品質調査を行った。

(ｳ) 天然添加物による浅漬けの微生物制御[5)]

病原菌接種浅漬けは(ｲ)と同様の方法で作成した。これに0.1%キトサン、0.2%ワサオーロ EXT あるいはこれらの混合物を添加し、保存試験を行った。実験は2連3反復で行った。また官能検査により、添加物の製品品質に与える影響を検討した。

(ｴ) 菌納豆菌の分離および浅漬けの微生物制御への応用

国内外の大豆発酵食品より分離された納豆菌株の抗菌性を、*Lactobacillus plantrum* および *Listeria monocytogenes* を指標菌として検定した。抗菌性を示した株につきRAPD PCR解析や抗菌性スペクトルの測定を行った。さらに国内株1株につきその特性評価を行い、さらにその培養上澄の部分精製物（8 A.U.）の浅漬中の食中毒原因菌に対する効果を(ｳ)と同様の方法で評価した。

ウ　研究結果

(ｱ) 7 log CFU/ml の濃度の大腸菌溶液に浸漬することで、6 log CFU/g レベル汚染白菜が得られ、これを溜水で洗浄することで約 1 桁生菌数を落とすことができた。pH2.2のクエン酸溶液（1.0g/l)、あるいは0.5g/l の亜塩素酸水溶液は水洗と同じ程度の洗浄殺菌効果しか示さなかった。なお、この亜塩素酸濃度は日本で使用が認められている最高濃度である。次亜塩素酸ナトリウム(100ppm)を使用すると約 2 桁生菌数を落とすことができるが、1.0g/l のクエン酸と併用しても統計的に有意な効果の上昇は見られなかった。一方、亜塩素酸はクエン酸の併用によって洗浄殺菌効果が約 2 桁上昇し、未洗浄区と比較すると 3 桁ほどの生菌数の低下が見られた。これは（クエン酸添加）次亜塩素酸洗浄区よりも有意に強い効果である。いくつかの有機酸について、その亜塩素酸との併用効果の違いを検討した。5mM のコハク酸・マロン酸・酒石酸・酢酸・乳酸およびプロピオン酸を0.5g/l の亜塩素酸と併用した場合、同モル濃度（1.0g/l に相当）のクエン酸を使用した場合と統計的に有意な差はみられなかった。ASC 洗浄前後の白菜の色調をカラーメーターで測定したところ、外部の緑色部、内部の黄色部および茎の白色部のいずれについても水洗・ASC 洗浄の両処理間で統計的に有意な色調の差は見られなかった。操作温度の ASC 洗浄殺菌効果に及ぼす影響について検討した。常温洗浄区と比較すると50℃洗浄区は約 1 桁ほど高い効果を示したが、明らかに葉の軟化が見られた。一方、4℃と常温の間では洗浄殺菌効果に有意な差は見られなかった。室温における超音波処理との併用は ASC の洗浄殺菌効果を変化させなかった。

(ｲ) 原料白菜には6.4，4.8 logs CFU/g の一般細菌および大腸菌群が付着しており、水洗で0.5、ASC 洗浄で2 Log-CFU/g 程度の減少がみられた。漬け込み後よりいずれも増加がみられたが、 6 日目までは ASC 洗浄区の方が水洗区よりも低い一般細菌数・大腸菌群数を示したが、 8 日目には両試験区の生菌数に大差は見られなかった。病原菌接種試験においては、いずれの菌についても洗浄直後に水洗で約 1 桁、ASC 洗浄で2桁以下の生菌数が低下し、漬け込み後 8 日目まで ASC 洗浄区が水洗区よりも低い生菌数を維持した。病原大腸菌・サルモネラおよび黄色ブドウ球菌は ASC 洗浄区・水洗区のいずれについても一時的に弱い増殖がみられるものの、おおむね洗浄直後と比較して1 Log-CFU/g 以内の範囲の生菌数を保っていた。これに対してリステリアは洗浄後より生菌数の増加がみられた（図2302-1)。これは同菌の低温増殖性を反映したものと考えられる。

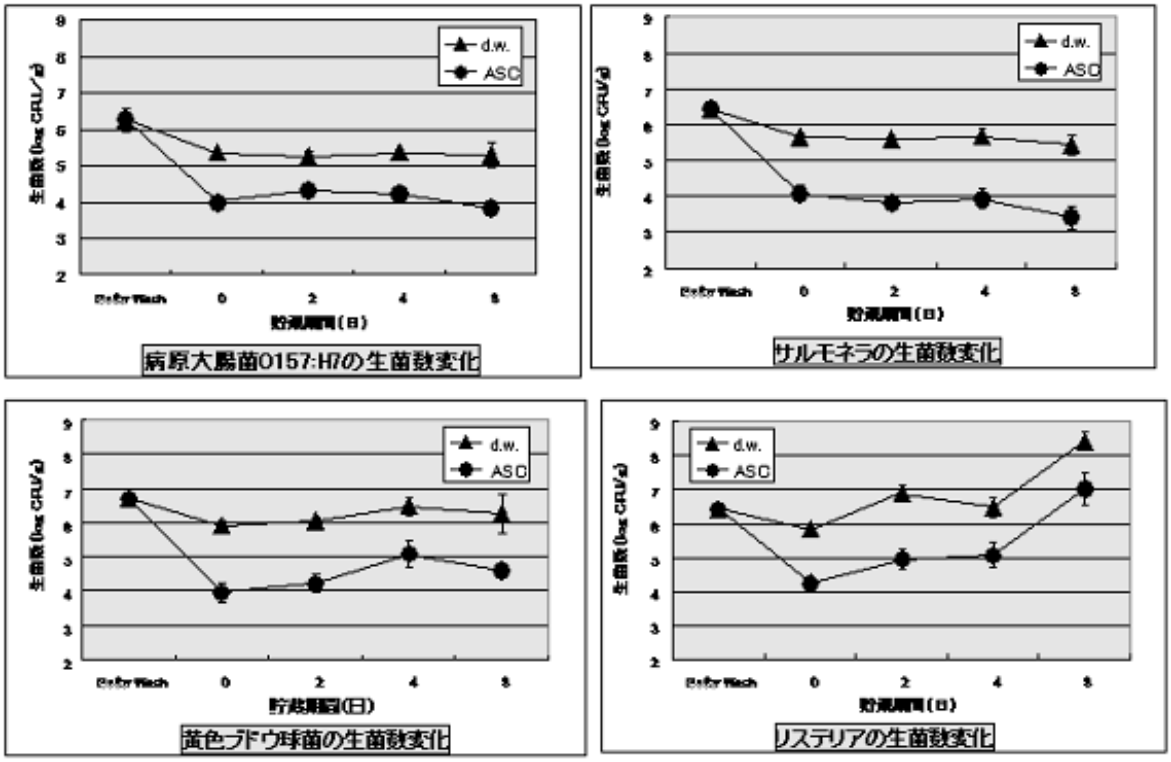


図2302-1　洗浄殺菌後に残存する食中毒原因微生物の挙動

ASC 洗浄処理の浅漬け製品の品質に及ぼす影響を調べるため、漬け込み後 1 日・2 日目の pH，乳酸量および色調の変化を測定したところ、両漬け込み期間についていずれの項目も ASC 洗浄の影響は見られなかった。さらに「色」「香り」「味」および「食感」について官能検査を行ったところ、全ての項目について水洗区と ASC 洗浄区の間に有意な差はみられなかった。水洗区では 4 日目から漬け液の濁度上昇および pH 低下が生じたが、ASC 洗浄区ではこのような傾向は見られなかった。

(ウ) 実験を行った 4 菌種のうち、リステリアのみが4日間10℃保存で1 log CFU/g 以上の増加を示した。ナイシンあるいは AIT-EX の単独使用でリステリアの増加は抑制できたが、これらの物質は静菌的にしか作用しなかった。キトサンは全ての菌種に対し殺菌的に作用し、4 日間でこれらの菌を1-1.5 log CFU/g 程度減少させた。リステリア以外の菌に関して、キトサンと AIT-EX の併用効果は見られなかったが、リステリアに関しては約1 log CFU/g 程度の殺菌力の向上が見られた。食品添加物を使用しない場合、白菜浅漬けに混入した病原菌が製造・流通期間中に自然死滅することは期待できない。AIT-EX はアリルイソチオシアネートとホップエキスを含み、乳酸菌の増殖抑制作用を有するために白菜漬けの賞味期限延長効果を持つことが示された。これとキトサンを併用することで、保存期間中に食中毒原因菌を最大で2 log CFU/g 程度減少させることが可能であることが示された。

(エ) 1960-80年代製造の日本国産発酵大豆より分離された菌株129株ならびに1997-2003年にかけて 7 ヶ国21地域で製造された同種食品より分離した93株をスクリーニングしたところ、(市販納豆菌製造株を含まない) 国内株18株・外国株21株のみが強い抗菌活性を示した。RAPD PCR 解析により、これらの株は現在の市販納豆菌株と類縁の国内菌株グループと、国内外の株を含むそれ以外のグループに 2 分された。これらの株の大半は病原菌である *Listeria monocytogenes* や *Staphylococcus pyrogens*、あるいは乳酸菌など広い範囲のグラム陽性菌に対して抗菌活性を示し、その活性生産量はナイシン A 生産性 *Lactococcus lactis* と同程度かそれ以上であった。これらの株より、もっとも強い抗菌活性を示した国内株 1 株を選び、特性評価を行った。抗菌物質は80℃、3 時間の熱処理に耐性を示す、プロテアーゼ感受性の低分子物質であった。大量培養条件を確立後、カラムクロマトグラフィにより抗菌物質の粗精製および濃縮を行った。これをリステリアを接種した白菜浅漬けに添加した所、少なくとも 5 日間は対照区よりも低い菌数を示すことが確認された。一般細菌に対しても同等の効果が得られたが、大腸菌群に対する効果は見られなかった。

エ　考　察

浅漬け類に混入した食中毒原因菌、とりわけ病原大腸菌 O157:H7は容易に死滅せず、場合によっては10℃保存で 2 ヶ月間以上も残存する。そこでこの種の食品の安全性を確保するため、(ア)原料野菜の新規洗浄殺菌技術の開発と(イ)その応用を行った。その結果、殺菌効果の向上を含めた一定の効果が得られたが、10℃保存中に残存する微生物が増殖するという問題点が発見された。そこで天然添加物による微生物制御を試みた。食品廃棄物から製造されるキトサンと、ワサビおよびホップ抽出物よりなる AIT 製剤の併用により、流通保存期間中に食中毒原因微生物の追加的な殺菌効果が期待できることが示された。上記の技術を組み合わせて使用することは、食中毒原因微生物の殺菌および増殖抑制を通じて、食中毒リスクを下げるのみならず、乳酸菌の増殖に起因する酸度と漬け液の濁度上昇による品質劣化をも抑制することが可能である。なお、成分分析および官能検査により、これらの処理が食品としての品質を劣化させないことが確認されている。これに加え、耐塩性・低温増殖性を持つ土壌由来食中毒原因微生物であるリステリアに対する強い抗菌性を持つ納豆菌を、1970年代製造の国産発酵大豆食品より分離することに成功した。これは浅漬け類のみならず、広い範囲の食品のグラム陽性微生物の増殖抑制に利用可能であることが期待される。

オ　今後の課題

今回開発した技術の食品製造現場への普及にあたっては、より大規模なプラントを使用した実証試験が必要であると考えられる。また抗菌物質生産性納豆菌の実食品の微生物制御への応用にあたっては、抗菌物質の同定および安全性の確認が必要であろう。

カ　要　約

浅漬け類の食中毒リスク低減を目的として、原料野菜の効果的な表面殺菌技術の開発と、天然添加物

による微生物制御手法の開発を行った。さらに新規バイオプリザベーション資材としての使用を目的として、大豆発酵食品より抗菌性物質生産性納豆菌を分離し、さらに浅漬けの微生物制御に応用した。

キ　引用文献

1. Yasuhiro Inatsu, Md. Latiful. Bari, Susumu Kawasaki and Kenji Isshiki. 2003. Construction and Validation of Antibiotic Resistance *Escherichia coli* O157:H7 Strains for Acidic Foods., Jpn. J. Food Microbiol. 20 (4), 177-183
2. Yasuhiro Inatsu, Md. Latiful Bari, Susumu Kawasaki and Kenji Isshiki. 2004. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, Salmonella Enteritidis, Staphylococcus aureus, and Listeria monocytogenes in Kimchi., J. Food Prot., 67(7), 1497-1500
3. Yasuhiro Inatsu, Md. Latiful Bari, Susumu Kawasaki, Kenji Isshiki, Shinichi Kawamoto. 2005. Efficacy of acidified sodium chlorite treatments in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on Chinese cabbage., J. Food Prot., 68(2), 251-255
4. Yasuhiro Inatsu, Yutaka Maeda, Md. Latiful Bari, Susumu Kawasaki, Shinichi Kawamoto. 2005. Prewashing with acidified sodium chlorite reduces pathogenic bacteria in lightly fermented Chinese cabbage., J. Food Prot., 68 (5), 999-1004
5. Yasuhiro Inatsu, Md. Latiful Bari, Susumu Kawasaki, Shinichi Kawamoto, 2005, Effectiveness of several natural antimicrobial compounds in controlling pathogen or spoilage bacteria in lightly fermented Chinese cabbage., J. Food Sci., 70(9), M393-397

研究担当者（稲津康弘*）

3　化学・物理的処理の併用による野菜の洗浄法の開発

ア　研究目的

腸管出血性大腸菌O157やサルモネラ属菌などの有害細菌の汚染を受けた農産物や食品を加熱せずに除去、殺菌することは困難である。一方、食生活の変化やカット野菜などの普及によりサラダなどの生野菜などを加熱せず摂食する機会が増加している。ここでは、レタスやキャベツに付着させたO157、サルモネラ、黄色ブドウ球菌などの食中毒菌のその除去・殺菌法を検討する。付着方法としてはカットした葉に付着させる方法と、種子に付着させ生育した葉を用いる方法を行う。殺菌剤としては品質に影響の少ない次亜塩素酸ナトリウムを主に用い、また焼成カルシウムなど他の薬剤も用いる。またその殺菌剤を複数併用させたり、温熱処理、攪拌、振とう、超音波処理など併用する。菌数を減らし、品質劣化の少ない条件を決定する。

イ　研究方法

(ｱ) 市販のレタスおよびキャベツの菌数を1－2年にわたり調査した。また外側内側に分け部位別の菌数も調べた。レタスおよびキャベツの各個体より分離した常在菌約60-90株について属レベルで同定した。レタスは葉片にし、キャベツは千切りにし、常在菌に対する水洗による菌の減少率を調べた。

(ｲ) *Staphylococcus aureus*、 *Escherichia coli* O157、*Salmonella* Typhimurium DT104をBHI液体培地で前培養後、0.85％食塩水で2回洗浄した。この菌体を0.85％食塩水に懸濁させ約10^6CFU/ml とした。レタス葉片もしくは千切りキャベツ10gに対し約150mlの菌液を用い、5分、1時間、もしくは2日間（1時間つけた後、液をきり2日冷蔵庫で放置）菌と接触させた。その後洗浄（5回）や次亜塩素酸ナトリウム（100-200ppm)、フマール酸(5-50mM)、焼成カルシウム(0.1-0.4%)、強酸性水などで処理し、菌の減少を調べた。その際、振とう（シェーカー、60回/分)、超音波処理、温熱処理（50℃、1分）なども同時に行った。その後水洗し、残菌数を測定した。*S. aureus*、*E. coli* O157、 *Salmonella* Typhimurium DT104に対しそれぞれ、マニトール食塩培地、アンピシリン添加HI寒天培地、XLD寒天培地を用いた。

(ｳ) 70％エタノールならびに1％次亜塩素酸ナトリウム、0.01％Tween溶液で滅菌したキャベツの種子に各食中毒菌を加え、その後シュートを MS 培地上25℃で約3週間生育させ、葉、茎、根の菌数をそれぞれ調べた。また、21日生育させたシュートの葉片に次亜塩素酸ナトリウム処理し、その菌数を調べ、葉片に菌を接種した場合と比較した。

ウ　研究結果

(ｱ) レタスならびにキャベツの常在菌の分析

レタスは、10^5～10^7/g の、キャベツは10^5～10^6/gの常在菌を含んでおり、内部は外部より10^1-10^2/g少ないものの内部でも菌は存在した。レタス、キャベ

ツとも *Pseudomonas* を主体としたグラム陰性菌が優先菌であった。

(ｲ) 水洗による菌数の減少

レタスの常在菌は5回の水洗により4分の1程度の菌数に減少し、キャベツの常在菌は3回の水洗で約4分の1ないし5分の1程度に減少した。次に *S. aureus*、 *E. coli* O157、 *Salmonella* Typhimurium DT104の3種の食中毒菌をそれぞれ添加し水洗の効果を調べた。この時菌との接触時間を5分、1時間、2日と変えた。その結果、レタス葉片に添加した3菌種の中では *S. aureus* が一番落ちやすく、5分接触では3％、2日放置しても7％しか残らなかった（図2303-1左)。O157と *Salmonella* は接触時間が長くなるにつれ落ちにくくなった。*Salmonella* では2日放置で常在菌とほぼ同じになった（図2303-1右)。

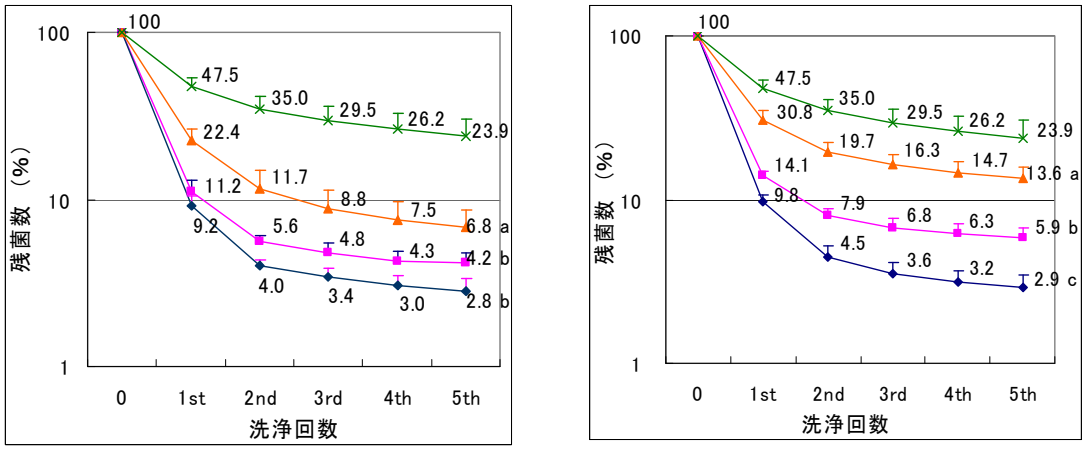


図2303-1　レタスに付着させた *Staphylococcus aureus*（左）および *Salmonella* DT104（右）に対する水洗の効果　×常在菌、◆5分、■1時間、▲2日

(ｳ) レタスに付着させた菌に対する殺菌剤の効果

各種殺菌剤や殺菌処理について常在菌に対する殺菌洗浄試験を行い、効果が大きく、品質に対して比較的影響が少ないと思われた、フマール酸、次亜塩素酸ナトリウム、50℃での温熱処理について添加食中毒菌に対してその殺菌効果を調べた。50mM のフマール酸10分処理は200ppm 次亜塩素酸ナトリウム10分処理より有効で、レタス常在菌が5％以下になった。レタス葉に付着させた *S. aureus*, O157, *Salmonella* に対しても5％まで減少させた(図2303-2)。しかし、貯蔵中レタスは褐変した。フマール酸存在下、50℃のヒートショックをかけると褐変が促進された。50℃の温熱処理1分と200ppm 次亜塩素酸ナトリウム処理の併用では94-98％ (1.2-1.7log)の減少が認められ、変色も起こらなかった。このとき浸透処理しても効果に顕著には上がらなかった。

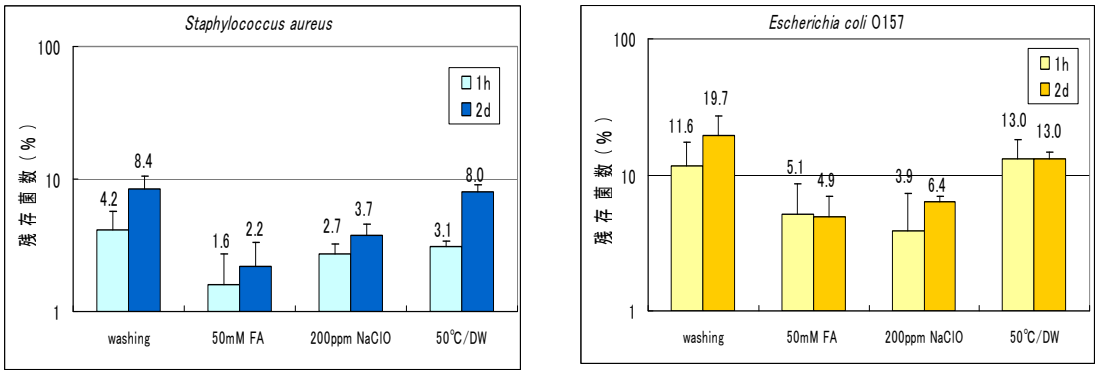


図2303-2　レタス葉に付着させた *Staphylococcus aureus*（左）と *Escherichia coli* O157（右）に対する殺菌剤の効果

菌を接種後1時間もしくは2日後に殺菌剤処理を行った。FA、フマール酸。

(エ) 千切りキャベツでも同様の実験を行った結果、ほぼ同様の結果を得たが、キャベツのほうが残菌数は数分の1程度少なく。レタスと比較すると殺菌されやすい傾向が認められた。

(オ) 種子に菌を接種し、生育させた葉に対する殺菌剤の影響

キャベツ種子に菌を接種した後、生育させ、葉片に対する殺菌剤の効果を調べ、葉に接種した場合と比較した。根において菌数は顕著に増加したが、葉でも増加した。次亜塩素酸ナトリウム処理で比べると、葉に付着させた場合と、種子に付着させ生育させた場合で、減少率を比較すると殺菌効果に有意な差は認められなかった（図2303-3)。

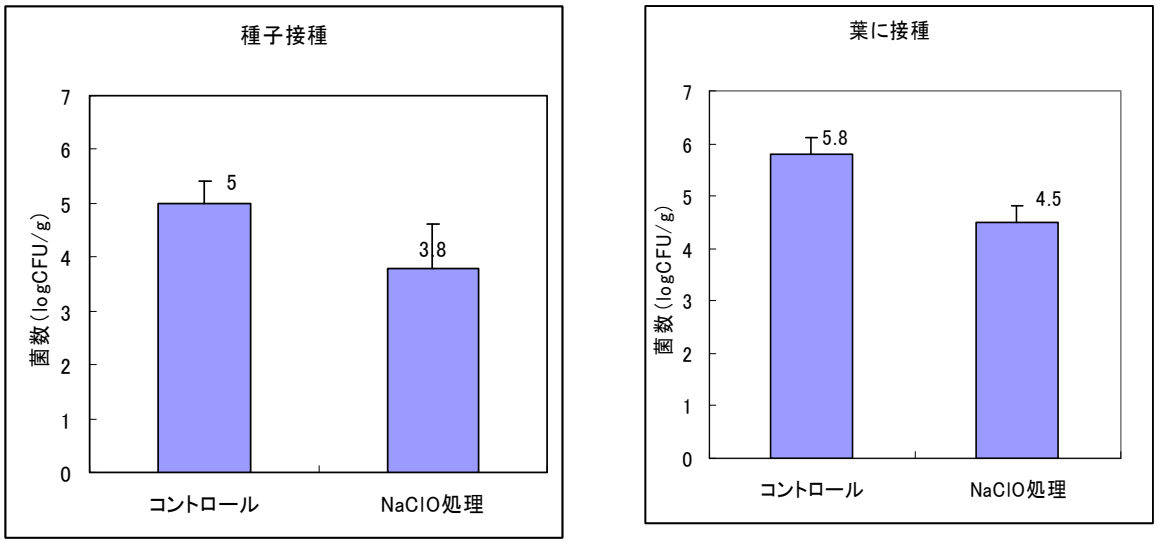


図2303-3　キャベツ葉に付着した *Salmonella* Typhimuriumu に対する次亜塩素酸ナトリウム(100ppm, pH6.0)の殺菌効果（左図、種子に菌を添加し、3週間生育させた葉；右図、千切りにしたキャベツ葉に菌を付着させた)

(カ) 焼成カルシウムの殺菌効果

千切りキャベツに菌を付着させ、焼成カルシウムの処理条件をかえ、その殺菌効果を調べた（表2303-1)。0.4%焼成カルシウムで5分間超音波処理すると検出限界以下まで菌数が減少したが、キャベツの損傷が著しかった。0.1%焼成カルシウム処理で菌数は千分の一まで減少した。貯蔵後、コントロールよりも傷みは早かったが処理直後ではコントロールと差がなかった。

表2303-1　焼成カルシウムの千切りキャベツに付着させた菌に対する殺菌効果

処理	減少率（-log）		
	S. aureus（3株混合）	*E. coli* 0157（2株混合）	*Salmonella*（2株混合）
次亜塩素酸ナトリウム pH6, 100ppm, 10分	2.48	2.37	2.35
焼成カルシウム　0.2%, 10分	2.87	3.04	2.88
0.4%, 10分	3.31	3.63	3.46
0.4%, 20分		3.81	
0.4%, ソニケーション5分	3.53	>4.00	>4.26
0.1%, 20分	1.79	3.53	3.59
0.1%,NaClO,100ppm 20分	2.84	3.33	3.34

エ　考　察

(ア) レタスやキャベツの常在菌

レタスは、10^5～10^7/g の常在菌を含んでおり、内部は外部より10^1-10^2/g 少ないものの内部でも菌は存在した。また *Pseudomonas* 属が主なものであった。これは既報の結果に一致した（Erconali, 1976; Magnuson ら, 1990)。また、この傾向はキャベツでも同様であった。

(イ) 菌の接触時間と水洗効果の関係

レタス葉に 5 分間付着させた食中毒菌は水洗により十分の一程度に減少したが、接触時間が長いと常在菌と同程度（数分の一程度）までしか落ちなかった。この傾向は、グラム陽性球菌である *S. aureus* よりも、グラム陰性桿菌である *E. coli* O157、*Salmonella* Typhimurium DT104のほうが著しく、洗浄での菌の落ちやすさには菌の形態や鞭毛などの表層構造が関与すると考えられた。

(ウ) 殺菌剤の効果

レタス葉に付着させた食中毒菌に対し、200ppm 次亜塩素酸ナトリウム処理、50mM フマール酸処理、50℃での温熱との併用処理を行った結果、50mM フマール酸処理が最も殺菌効果が強かったが、変色が認められ実用的処理には適さなかった。50℃の温熱処理と次亜塩素酸ナトリウムの組みあわせででも品質を保ち殺菌できたが、菌数はもとの94-98%まで減少した。これらの傾向はキャベツでも同様であった。Delaquis (1999) が殺菌剤と温熱処理との併用の有効性について報告しているが、一方 Li ら（2001、2002）は有効ではないとしている。

千切りキャベツに菌を付着させた場合、0.1%焼成カルシウム処理で菌数は千分の一程度まで減少し、外観もそれほど損傷を受けなかった。貯蔵後はコントロール処理よりも劣化が早い傾向を示したが、摂食前の処理としては使用可能であると考えられた。

(エ) 種子に付着させ、その後葉に移行した菌に対する殺菌剤の効果

葉に直接菌を接種するのではなく、栽培の段階から汚染されていた場合を想定し、キャベツ種子に菌を接種し、その後生育させ、葉に存在する菌に対する殺菌剤（次亜塩素酸ナトリウム）の効果を調べた。内部にいるほど殺菌されにくいと想定したが、種子に付着させた場合も、葉に付着させた場合と同程度殺菌された。この結果は、内部から汚染を受けても、外部から汚染を受けても殺菌効果にはそれほど著しい差がないことを示しており、外部汚染を十分殺菌できる方策をとれば内部汚染にも対応できる可能性を示唆した。

オ　今後の課題

(ア) 殺菌処理の最適化

キャベツの場合0.1%焼成カルシウム処理が最もよく殺菌し、千分の一以下の菌数にまで減少した。しかし、貯蔵中の劣化が早い傾向が認められた。貯蔵中にも劣化しにくい殺菌方法の開発が望まれる。

(イ) 殺菌剤が聞かない理由の解明

次亜塩素酸ナトリウムなどの殺菌剤が葉に付着させた場合著しく効かなくなる理由が不明である。気孔などの微小空間にはまる、バイオフィルムを形成するなどの考察があるが、短時間の接触で相当数の菌が生残する理由としては十分なものとは考えられない。焼成カルシウム処理でも、次亜塩素酸ナトリウム処理でも組織が痛むほどの処理をすると菌数は激減する。菌の存在状態と殺菌剤との関連の解明が求められる。

カ　要　約

(ア) レタスやキャベツの常在菌

レタスは、10^5～10^7/g の常在菌を含んでおり、内部は外部より10^1-10^2/g 少ないものの内部でも菌は存在した。また *Pseudomonas* 属が主なものであった。

(イ) 付着時間と水洗の効果の関係

レタス葉に 5 分間付着させた食中毒菌は水洗により十分の一程度に減少したが、2 時間、2 日と接触時間を長くすると常在菌と同程度（数分の一程度）までしか落ちなくなった。また、この傾向は、グラム陽性球菌である *S. aureus* よりも、グラム陰性桿菌である *E. coli* O157、 *Salmonella* Typhimurium DT104のほうが著しかった。

(ウ) 殺菌剤処理の効果

レタス葉に付着させた食中毒菌に対し、50mM フマール酸処理が最も殺菌効果が高かったが、変色が認められ実用的処理には適さなかった。50℃の温熱処理と次亜塩素酸ナトリウムの組みあわせでは品質を保ち殺菌できた、菌数は94-98%減少した。

千切りキャベツに菌を付着させた場合、0.1%焼成カルシウム処理で菌数は千分の 1 程度まで減少し、外観もそれほど損傷を受けなかった。貯蔵後はコントロール処理よりも劣化が早い傾向を示したが、摂

食前の処理としては使用可能であると考えられた。以上の結果の一部は、投稿論文として発表した（Kondo ら2006）

(ｴ) 種子に付着させ、その後葉に移行した菌に対する殺菌剤の効果

種子に菌を付着させたのち生育させた葉に対する次亜塩素酸ナトリウムの効果を調べたところ、葉に付着させた場合と同程度殺菌された。この結果は、内部から汚染を受けても、外部から汚染を受けても殺菌効果にはそれほど著しい差がないことを示しており、外部汚染を十分殺菌できる方策をとれば内部汚染にも対応できる可能性を示唆した。

キ　引用文献

Ercolani, G. L. 1976. Bacterial quality assessment of fresh marketed lettuce and fennel. *Appl. Environm. Micobiol.* 31：847-852.

Delaquis, P., S. Stewart, P. Toivonen, and A. Moyls. 1999. Effect of warm, chlorinated water on the microbial flora of shredded iceberg lettuce. *Food Res. Int.* 32：7-14.

Magnuson, J. M., A. D. King, and T. Torok. 1990. Microflora of partially processed lettuce. *Appl. Environ. Microbiol.* 56：3851-3854.

Kondo, N., Murata, M., and Isshiki, K. 2006. Efficiency of sodium hypochlorite, fumaric acid and mild heat in killing native microflora and *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium DT104, and *Staphylococcus aureus* attached to fresh-cut lettuce. *J. Food Protect.* 69：323-329.

Li, Y., R. E. Brackett, J. Chen, and L. R. Beuchat. 2001. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated onto cut lettuce before or after heating in chlorinated water, followed by storage at 5 or 15°C. *J. Food Prot.* 64：305-309.

Li, Y., R. E. Brackett, J. Chen, and L. R Beuchat. 2002. Mild heat treatment of lettuce enhances growth of *Listeria monocytogenes* during subsequent storage at 5 or 15°C. *J. Appl. Microbiol.* 92：269-275.

研究担当者（村田　容常*、近藤望美、渡辺優子、福山さとみ）

4　電子線･放射線照射による畜産加工食品の殺菌技術の開発と評価

ア　研究目的

生肉の生産段階での特に低温でも増殖可能なリステリア・モノサイトゲネスの汚染が、流通・加工段階で増殖することにより、食中毒被害をもたらすことが国際的な問題となっている。電子線や放射線殺菌は乾式の非加熱殺菌法としての特徴を有し、後者は現在、我が国を除く欧米諸国を始め多くの国で生肉の殺菌に利用されている。また、透過力の小さい低エネルギー電子線照射は、内部の組織等への影響を最小に抑えて表面の汚染微生物を殺菌できる技術として最近注目されている。そこで本研究では、国産ひき肉の品質低下を引き起こすことなく、食肉由来食中毒菌リステリア・モノサイトゲネスを殺菌できる放射線照射条件の確立を目的とする。

イ　研究方法

(ｱ) 材料として、低脂肪含量の高品質豚ひき肉を使用した。リステリア・モノサイトゲネス４菌株のカクテルを接種したひき肉を調製した。リステリア接種および非接種肉を種々の線量（0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 kGy）で放射線照射後、冷蔵（0℃、60日間；4℃、１週間）および冷凍（－18℃、60日間）保存した。非感染照射ひき肉を用いて保存中の一般細菌数、大腸菌群数および真菌（カビ・酵母）数を経時的に測定した。感染ひき肉を用いて、保存中のリステリアの生菌数を経時的に測定した。コントロールとしては、非照射のリステリア感染および非感染ひき肉を用いた。

(ｲ) 保存中の照射(3kGy)・非照射ひき肉の生化学的品質検査として、TBSR アッセイによる脂肪酸酸化を測定した。

(ｳ) 4.0kGy 放射線照射および非照射挽肉を30日間凍結保存後、37℃で解凍したひき肉から調味料無添加のソーセージを調理した。そして照射・非照射ひき肉由来のソーセージの官能検査（味・色調・風味・かおり・食感）を33人のパネリストにより実施した。

ウ　研究結果

(ｱ) 3kGy 以上の照射線量で豚ひき肉の常在菌（一般細菌・大腸菌群・真菌）および接種したリステリア菌（10^5-10^6/g)を完全に殺菌できることが明らかとなった（図2304-1、図2304-2)。一方、非照射ひき肉においては、冷蔵で常在細菌の保存期間中の増殖が

認められ、また冷凍では保存期間中菌数の増減は認められなかった。そしてリステリア菌に関しては、冷蔵・冷凍において菌数は保存期間中一定のままであった。

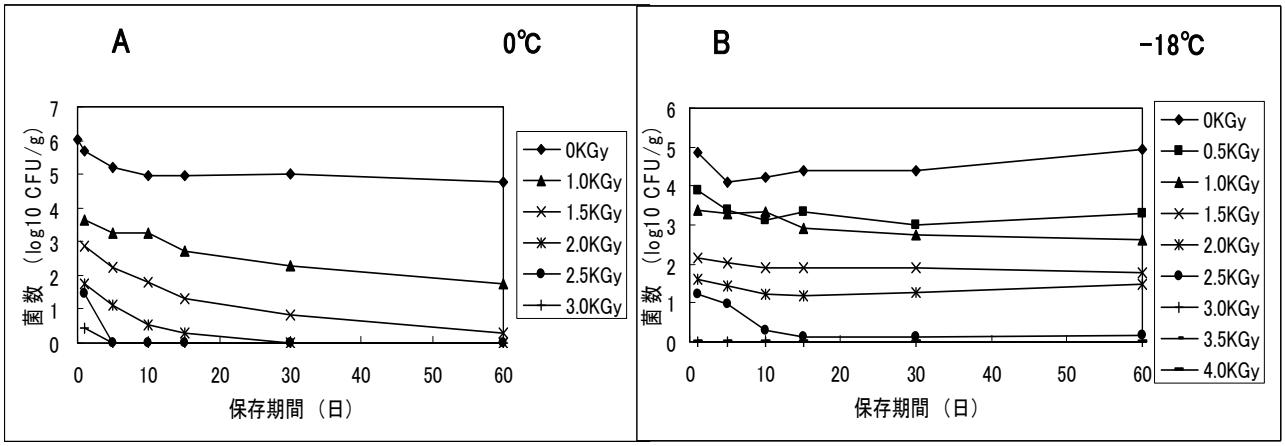


図2304-1　照射・非照射のリステリア接種豚ひき肉の冷蔵(A)および冷凍(B)保存中の菌数変化

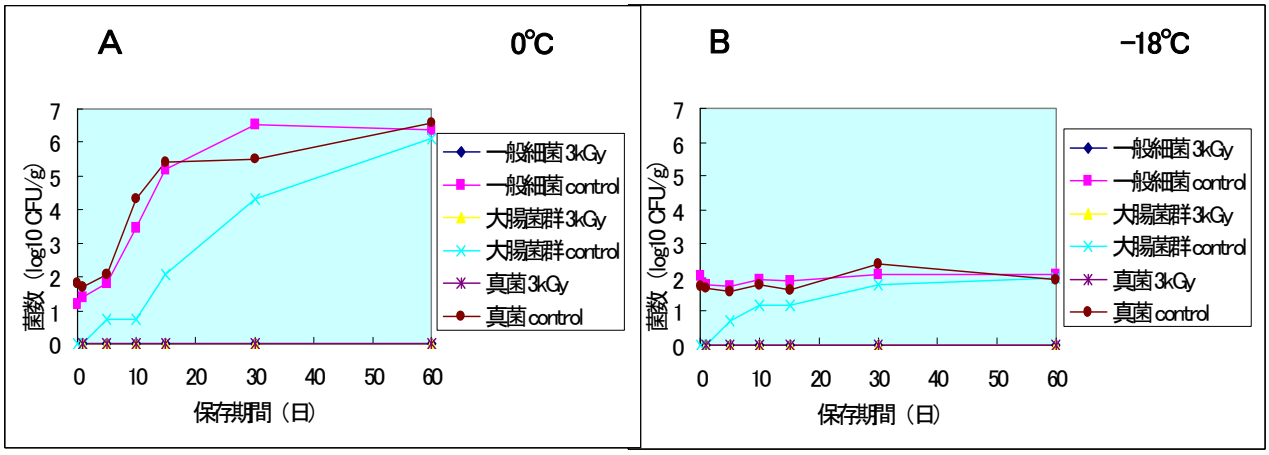


図2304-2　照射・非照射豚ひき肉の冷蔵(A)および冷凍(B)保存中の常在菌数変化

(ｲ) 3kGy 照射と非照射のひき肉の間で、冷蔵・冷凍保存いずれにおいても脂肪酸酸化の程度に差は殆ど認められなかった。

(ｳ) 4kGy 照射と非照射ひき肉の冷凍保存したものから調理したソーセージの官能検査の結果、両者の間に味・色調・風味に関して有意差は認められなかったが、かおり・食感に関しては有意差が認められた（図2304-3、表2304-1）。

図2304-3　官能検査に用いた冷凍保存の照射・非照射ひき肉から調理したソーセージ
ソーセージはひき肉を成形袋詰めし、調味料無添加で10分間煮沸調理して調製した。

表2304-1　30日間冷凍保存した照射と非照射ひき肉から調理したソーセージの官能検査

検査項目	照射・非照射ひき肉間の有意差検定結果
味	有意差なし
色調	有意差なし
風味	有意差なし
かおり	あり(P< 0.01)
食感	あり(P< 0.05)

33人のパネリストによる3点識別法による官能検査を行った。

エ　考　察

(ア) 豚ひき肉の常在細菌は、保存期間中に冷蔵(0℃)では増殖し、また冷凍では生存しその菌数の増減はないことが明らかとなった。さらにリステリア菌を接種した場合には、冷蔵・冷凍において生存しその菌数は保存期間中一定のままであることが判明した。従って、食中毒や腐敗のリスクを低減するためには、微生物学的安全性確保の上で生肉の生産加工段階での衛生管理を徹底することが重要であると共に、我が国では認められていない放射線照射に代わる非加熱殺菌技術を開発する必要がある。

(イ) 米国では、病原菌制御のための放射線照射が赤身肉で認められており、その最大許容照射量は冷蔵肉で4.5 kGy また冷凍肉で7kGy である。今回の研究では、冷蔵・冷凍豚ひき肉共に低線量の3 kGy で常在菌(一般細菌・大腸菌群・真菌)および接種したリステリア菌(10^5-10^6/g)を完全に殺菌できることを示した。またこの低線量条件では品質に与える影響もほとんどなく、従って優れた殺菌条件が確立されたと考えられる。

オ　今後の課題

今回の研究において、欧米諸国で認可されている放射線照射が、生肉の微生物学的安全性確保の上で優れた非加熱殺菌技術であることが明らかとなった。しかしながら、我が国では食品照射は現時点で認められていない。従って放射線照射に代わる生肉に対する優れた非加熱殺菌技術の開発が今後必要である。

カ　要　約

低線量3 kGy の放射線照射で豚ひき肉に接種した食中毒菌リステリア・モノサイトゲネス(> 5.0 log CFU/g)と常在菌(一般細菌・大腸菌群・真菌)を完全に殺菌できた。3 kGy 照射肉と非照射肉の間で、冷蔵および冷凍保存いずれにおいても脂肪酸酸化の程度に差は殆ど認められなかった。4kGy 照射と非照射ひき肉の冷凍保存したものから調理したソーセージの官能検査の結果、両者の間にかおり・食感に関して有意差が認められたが、味・色調・風味に関しては有意差が認められなかった。従って、豚ひき肉への低線量照射は、品質に影響をほとんど与えることなく食中毒菌リステリア・モノサイトゲネスを殺菌できる優れた非加熱処理技術であることが示された。

キ　引用文献

1. Md. Latiful Bari, M. Mochida, V. K, Juneja, F. Hayakawa, S. Todoriki, S. Kawamoto 2005. Irradiation inactivation of *Listeria monocytogenes* in low fat ground pork at frozen and refrigerated temperature. 第11回放射線プロセスシンポジウム講演要旨・ポスター発表要旨集, p113 東京(日本科学未来館)
2. S. Todoriki, Md. Latiful Bari, S. Kawamoto 2005. Elimination of *Listeria* in ground pork by gamma-ray, and analytical method to detect radiation history. 34nd UJNR Food and Agriculture Panel Meeting (Susono), Proceedings: p318-322.

研究担当者(Md. Latiful Bari *、等々力節子、川本伸一)

5　予測微生物的解析を用いた物理化学的処理および微生物制御技術の開発

ア　研究目的

加熱殺菌が適用できない野菜などの生鮮物の微生物的安全性確保が重要な課題となっている。さらには、食品の高品質で安全な加工食品の製造のための新しい殺菌技術が要望されている。本研究では、そのような微生物制御技術について効果的に試験を実施して実際の食品への適用可能な最適処理条件の検討などに予測微生物学的な手法を用いて、非加熱的

物理処理を用いた殺菌技術や熱劣化の少ない加熱殺菌技術を開発し、食品処理工程への導入可能性を探ることを目的する。

イ　研究方法

(ｱ) 担当研究室で開発した交流高電界殺菌装置（図2305-1）を用いて、殺菌効果の検討を実施する。まず基礎的検討について大腸菌を添加した0.1%の食塩水に電界強度を変化した交流高電界を印加し、処理後の材料1ml 中の大腸菌数を寒天培地で培養し、計測する。さらに電界と温度の影響を区別するため、0.01%から0.5%の濃度の異なる食塩水を材料として、処理温度が所定の値になるように印加電界を制御し、処理後の大腸菌数を計測する。また交流高電界殺菌におけるモデル化として、予測微生物関数に処理温度および印加電界を付加した NN のモデルを検討する。最終的に実用化のために60L/h の試験機を用いて連続式交流高電界殺菌装置を用いて、食塩水及びリンゴ果汁、オレンジ果汁に添加した大腸菌、枯草菌胞子での殺菌試験により最適条件設定のためのデータの集積を行ない交流高電界殺菌処理の最適条件設計のための制御因子を用いた制御での安定的な殺菌効果が得られるかの確認を行なう。

(ｲ) 酸性電解水、オゾン水を用いて、レタスなどの野菜に付着した微生物や殺菌の困難なバイオフィルム中の大腸菌の殺菌試験を実施して、データの集積を行う。収穫後に流通・貯蔵、処理される過程でのレタスの微生物増殖挙動などを解析し、それらの予測モデルの作成、さらに電解水処理を施したレタスなどの生鮮物の貯蔵中や微生物汚染のリスクなどを評価するモデルを検討し、電解水処理などの効果的な利用工程を提案する。

(ｳ) 食品の微生物汚染の予測のためにモデルを開発する。現在のロジステック関数などの数学モデルでは、微生物挙動を直接現していないことが課題のため、２分裂して増殖する対数期のバクテリアの簡単なモデルを設計して確率セルオートマトンのプログラムを開発し、低密度状態を含む増殖予測について検討する。

ウ　研究結果

(ｱ) 各種濃度の食塩水に添加した大腸菌に印加電界を変えて20kHz の交流高電界を印加したところ、5kV/cm 以上の電界を印加した場合に、電界強度が高いほど、大腸菌数が減少することがわかった。交流高電界処理では印加電界の上昇とともに通電加熱による発熱が大きくなるため温度が高くなる。一定の温度条件で電界による殺菌効果を検証するため、食塩の濃度を変え、処理温度が65℃および70℃のときの印加電界と大腸菌数をプロットした。この結果、同一温度条件では印加電界と大腸菌数の対数との間には比例関係があることがわかった。60℃、75℃、80℃の恒温槽中に0.1%食塩水に添加した大腸菌数の時間経過をプロットした。各温度における大腸菌数の実測値を以下のロジスティック関数で近似した場合の各係数値（A，B，C，D）を最小二乗法で求めた。

$$F(T) = A + \frac{B}{1 + \exp(C - D \cdot T)} \qquad \cdots\cdots \text{式(1)}$$

各処理温度における大腸菌数の変化を近似するロジスティック関数の係数値(A，B，C，D)および処理温度（T）を入力因子、補正された係数値（A’,B’,C’,D’）を出力因子とする NN（ニューラルネットワーク）に式（１）で求めた教師データを用いて学習した。10000回学習後、処理温度と時間経過をｘ軸とｙ軸、菌数変化をｚ軸にとり、大腸菌の応答局面を図2305-2にプロットした。60L/時の準実用規模の交流高電界殺菌装置を試作し、殺菌処理を実施し、処理流量、処理電圧、処理圧力、温度、材料の電気伝導度などの処理データと各条件での対象微生物の生残数さらに食品の一部については品質評価などの実験データを蓄積し、最適処理条件の設計のための制御因子（電極面積、電極間隙、処理電流）を明らかにした。また電界強度、温度に加えて処理圧力が殺菌効果を左右する因子であることを突き止め、各制御因子の殺菌効果の発現挙動を明らかにした。(図2305-3～5)。

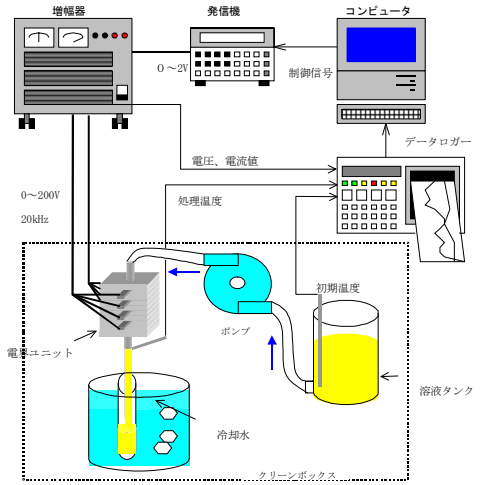


図2305-1　交流高電界殺菌装置

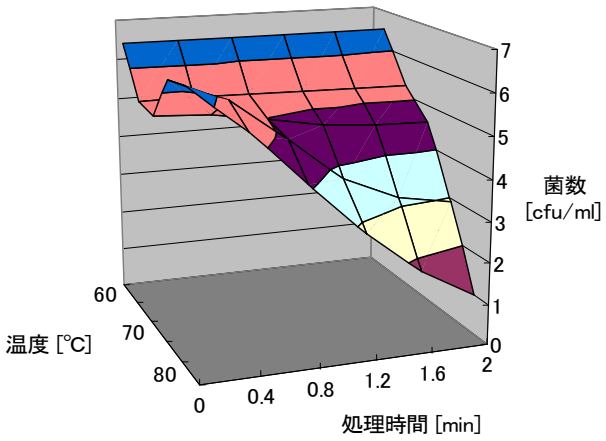


図2305-2　NN による予測微生物応答局面

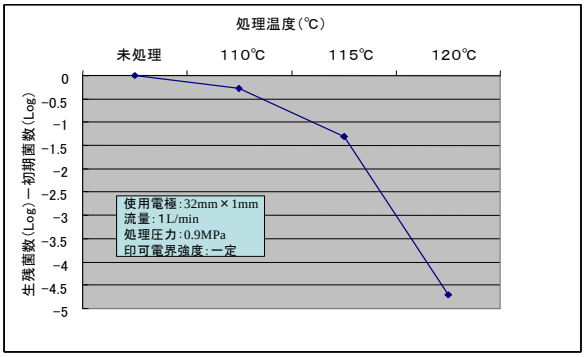


図2305-3　交流高電界処理での処理温度が枯草菌胞子に及ぼす影響

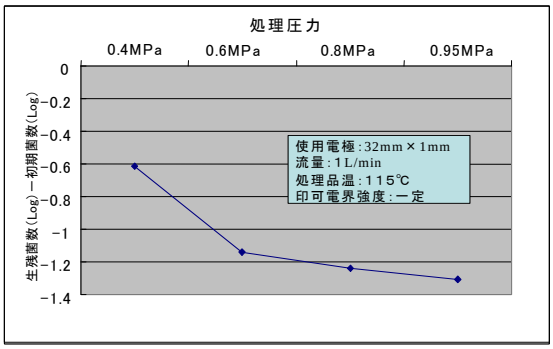


図2305-4　交流高電界処理での処理圧力が枯草菌胞子に及ぼす影響

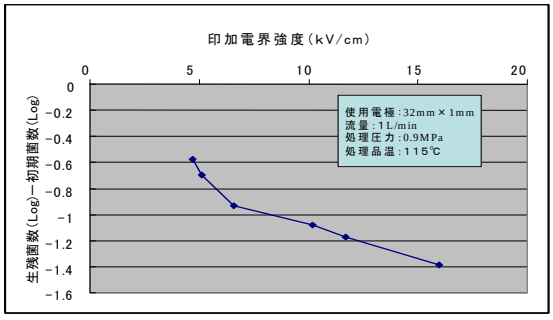


図2305-5　交流高電界処理での印加電界強度が枯草菌胞子に及ぼす影響

（イ）大腸菌のバイオフィルムをステンレス表面に形成させる実験系を構築して、殺菌試験を実施したところ、アルカリ性電解水での予備浸漬後の強酸性電解水処理でバイオフィルム中の大腸菌を死滅させることが確認できた。流通過程におけるレタスの温度履歴の測定により輸送中の温度変化が比較的大きいこと，またそれに伴い細菌の増殖も確認でき、さらにレタス上での病原性細菌の増殖を概ね良好に予測することができた（図2305-6～7）。また野菜表面の汚れが殺菌処理に影響を与えること、洗浄除菌後のコンタミネーションにより増殖速度や最大菌密度が増加することを明らかにし（図2305-8）、実際の野菜等の洗浄除菌の最適処理法の設計に有効なデータを得た。電解水処理やオゾン水処理での野菜等の洗

浄処理では、実際の泥つきの野菜では、物理的洗浄処理などの併用が不可欠であること、さらに実用規模に近い殺菌試験でも殺菌処理後の残存微生物の増殖速度が速くなることを見出した。それらの結果から、汚れ除去や褐変防止の意味で、50℃程度の温水（アルカリ性が望ましい）で処理後、冷水での洗浄処理、さらには低温での流通が望ましいシステムとして提案できた。

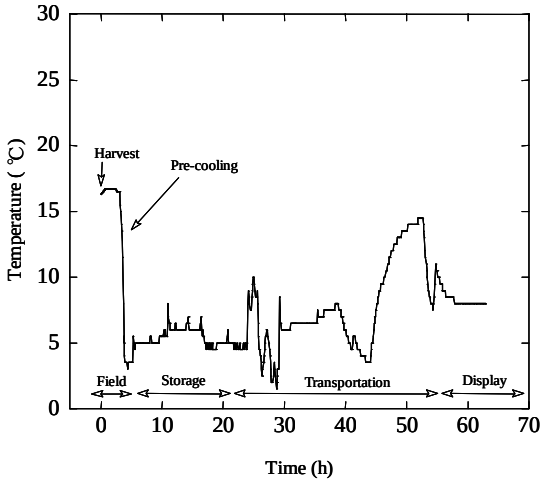


図2305-6　レタスの温度履歴

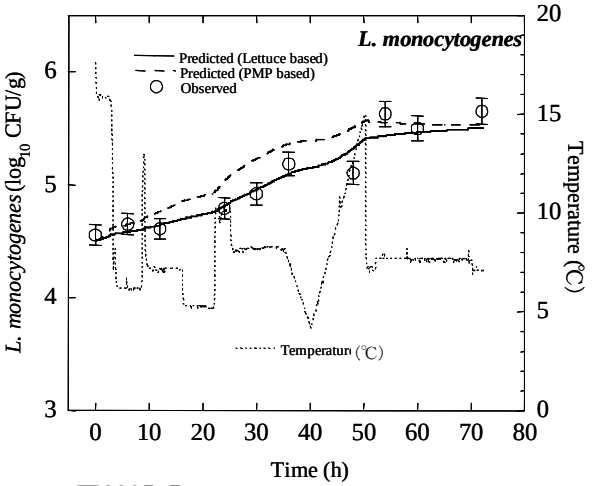


図2305-7　流通過程における
レタス上での細菌増殖予測

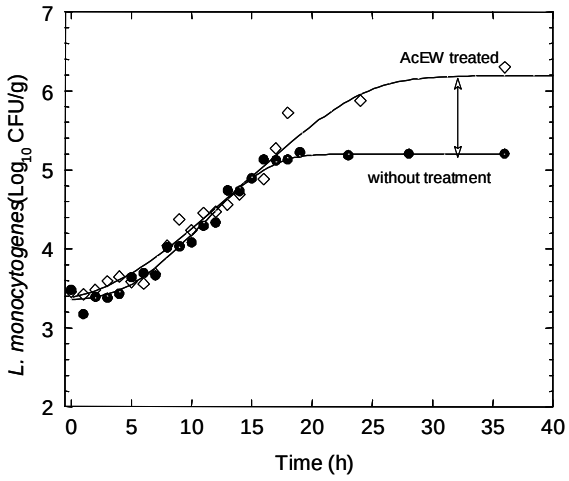


図2305-8　殺菌処理の増殖挙動への影響
（AcEW：酸性電解水）

(ｳ) セルオートマトンによる確率モデルのシミュレーションを行い、微生物の初期の分布状態が個体数の増加に関して大きな影響を与えることを明らかにし、また微生物試験等での挙動確認の困難な1000個/g 以下の低密度の菌数増殖の予測を目的とし、がん細胞の増殖モデルとして知られているEdenモデルを基にした確率的細菌増殖モデルを開発した。

エ　考　察

(ｱ) 非加熱的物理処理を用いた殺菌技術や熱劣化の少ない加熱殺菌技術の開発を目的としたが、検討した殺菌処理において、交流高電界殺菌処理では、従来の栄養細胞への殺菌作用として電界による膜緊縮による細胞破壊が想定されたが、本殺菌処理では、電界暴露時に発生するジュール熱による熱効果が殺菌効果に影響を与えることが明らかになった。さらに胞子に対しての殺菌では、処理中の圧力なども殺菌効果の制御因子として作用していることが明らかになった。これらは技術の実用性に有効なデータとなったが、このような作用としては、微生物の熱感受性に電界強度や処理圧力が影響を与えて複合的な条件での殺菌効果の発現を示唆するものである。

(ｲ) 野菜等への電解水処理やオゾン水処理では、アルカリ性水溶液との併用処理で殺菌効果が向上したことについては、アルカリ性水溶液の界面活性効

果及びタンパク質などの汚れ成分の可溶化に起因するものと考えられる。また殺菌後に表面微生物が減少した後の増殖速度が増加している知見が得られ、処理後の温度管理などの重要性が示唆された。この原因としてこれらの処理による野菜表面の若干の損傷による微生物増殖のための栄養源の提供の可能性も一部示唆されているが、表面の走査電子顕微鏡観察などではその形跡については、一部高濃度のオゾン水処理で認められているのみであり、主要微生物の低減による微生物相の変化による可能性も示唆される。バイオフィルムの除去･殺菌においても同様な現象が出る可能性もあり、この原因についてはさらに検討する必要がある。

(ｳ) 微生物の増殖モデルについては、初期微生物数のきわめて少ない条件での増殖挙動についてモデル化できたが、単一の菌挙動であり、実際には多様な微生物相となっている食品上の微生物挙動についても同様な振る舞いをするかについても興味のもたれるところである。

オ　今後の課題

生鮮物対応の殺菌技術あるいは電界効果を用いた熱劣化抑制型の殺菌技術の開発とその最適化に関して処理効果や処理後の微生物挙動などについて予測微生物学を利用して検討してきた。交流高電界殺菌処理は最適条件や殺菌因子が明らかになったことで現在実用化を検討中であるが、その他の殺菌技術については、さらに実用化のために用途別の最適処理法の確立を行う必要がある。特に野菜表面などのバイオフィルムについては除去殺菌技術の要望が高く、今までの知見を利用して食品表面及び装置表面でのバイオフィルム対策技術の開発を今後は進める必要がある。予測微生物学が殺菌処理や微生物挙動などに有効であることはある程度確認できたが、今後微生物のリスク管理等に利用するためには、実際の食品などの工程でのモデル化や実食品でのデータの集積が必要である。

カ　要　約

生鮮物対応の殺菌技術あるいは電界効果を用いた熱劣化抑制型の殺菌技術の開発とその最適化に関して処理効果や処理後の微生物挙動などについて予測微生物学を利用して検討を実施し、交流高電界殺菌処理では実用化に資する装置改良や殺菌処理を実施し、最適処理条件の設計のための制御因子を明らかにした。野菜などの殺菌処理として電解水やオゾン水での洗浄殺菌処理を実施し、アルカリ性電解水での予備浸漬後の強酸性電解水処理でバイオフィルム中の大腸菌を死滅させることを確認し、野菜表面汚れが殺菌処理に影響を与えること、洗浄除菌後のコンタミネーションにより増殖速度や最大菌密度が増加することを明らかにし、実際の野菜等の洗浄除菌の最適処理法の設計に有効なデータを得た。

微生物汚染などのリスク管理のための増殖モデルを開発した。

キ　引用文献

K. Uemura, & S. Isobe, 2002, Developing a new apparatus for inactivating Escherichia coli in saline water with high electric field AC., Journal of Food Engineering, 53, 203-207

K. Uemura and S. Isobe, 2003, Developing a new apparatus for inactivating Bacillus subtilis spore in orange juice with high electric field AC under pressurized conditions, Journal of Food Engineering, 56, 325-329

S. Koseki, S. Isobe, 2005a, Growth of Listeria monocytogenes on iceberg lettuce and solid media, International Journal of Food Microbiology, 101, 217-22

S. Koseki, S. Isobe, 2005b, Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table, International Journal of Food Microbiology, 104, p. 239-248

佐々木優子、前川孝昭、吉田恭一郎、五　十部誠一郎、2003、バイオフィルムモデルを用いた強酸性電解水、オゾン水の殺菌効果の検討、日本防菌防黴学会第30回年次大会要旨集、p. 94

K. Sakamoto and S. Isobe, 2004, Simulation of Probabilistic Bacterial Growth Model for Low Cell Density Targeted Under Detectable Level by Conventional Culture Method, 第14回日本数理生物学会年会（2004年数理生物学国際シンポジウム）要旨集 CD 版

研究担当者（五十部誠一郎*、植村邦彦、小関成樹、坂本晋子）

6　予測微生物学的解析を用いた超高圧殺菌技術の開発

ア　研究目的

微生物リスクアセスメントでは、有害微生物・ウィルスの死滅挙動の予測手法の開発が求められ、予測微生物学が進展しつつある。米国、フランス等からデータ提供及び予測モデルの開発等での協力が求められている日本では、その研究開発が急がれている。一方、超高圧殺菌は、食品の生の風味を損なわない非熱的殺菌技術として肉、魚介類、ジュース等を対象に実用化されているが、その殺菌効果の予測微生物学的評価手法は確立していない。本研究では、微生物リスクアセスメントの発展に資するため、超高圧殺菌における殺菌データ集積、予測微生物学的評価手法の開発を目的とする。

イ　研究方法

(ｱ) モデル系の高圧処理における予測微生物学的評価

a　モデル系微生物の調製

モデル系の微生物として大腸菌 ATCC25922株を用いた。凍結保存培地を一白金耳とり、液体培地（BBL Trypticase Soy Broth）で18時間前培養し、この菌液を液体培地で 5 倍希釈して 1 時間培養し、更にそれを液体培地で 5 倍希釈して光学密度0.45～0.65になるまで培養し、種菌(～10^9個/ml)とした。

b　モデル系液状食品の高圧処理

種菌液をモデル液状食品のリン酸緩衝生理食塩水（pH6.8）で10倍希釈し、プラスティック袋に入れて密閉し、25℃で超高圧処理した。処理菌液をリン酸緩衝生理食塩水で段階希釈し、標準寒天培地に混釈して培養し、生菌数を測定した。

c　モデル系での予測微生物学的評価

縦軸に生菌数、横軸に処理時間をとった図を作製し、SAS プログラムにより Weibull 式等の各予測式でフィッティングした。従来の Logistic 式及び Gompertz 式は不適であったので、lag time を含まず、処理時間 t=0で初発菌数 N_0となる形にそれぞれ修正改良した。

(ｲ) 液状食品の高圧処理における予測微生物学的評価

a　摂取する菌および液状食品

病原菌として、*Escherichia. coli* O157:H7および *Salmonella* の菌株各 4 種から、実験により高圧耐性の最も高い菌株をそれぞれ選択して実験に用いた。液状食品の代表としてトマトジュースおよび液卵を選び、そこでの殺菌挙動を、選択培地および非選択培地での培養により調べた。

b　処理後の保存温度の影響

10^9CFU/ml で接種し、250MPa で30分間処理後、4℃、25℃、37℃で24時間保存し、非選択培地で培養した。

c　高圧処理温度の影響

高圧処理を行う温度を変え、その殺菌効率の違いを調べた。

d　液状食品での予測微生物学的評価

縦軸に生菌数、横軸に処理時間をとった図を作製した。更に、モデル系微生物大腸菌 ATCC25922株で良好にフィッティングした Weibull 式を用い、SAS プログラムにより予測式でフィッティングした。

ウ　研究結果

(ｱ) モデル系の高圧処理における予測微生物学的評価

初発生菌数は毎回ほぼ10^8個/ml であった。300MPa の処理では数分以内、250MPa では30分以内に生菌は検出されなくなった。200MPa 以下の処理圧力では、菌は部分的に不活性化され、100MPa では殆ど不活性化効果が見られなかった。いずれの処理圧力に於いても不活性化曲線は下に凸の曲線となった（図2306-1)。

不活性化曲線のフィッティングでは、修正 Logistic 式、修正 Gompertz 式、Weibull 式を用いた(図2306-2)。修正 Logistic 式及び修正 Gompertz 式では不活性化効果が早めに得られる予測となり、Weibull 式での予測が妥当であることが示唆された（図2306-3)。

各処理圧力で得られた変数を補間し、データをシミュレート可能とした（図2306-4)。

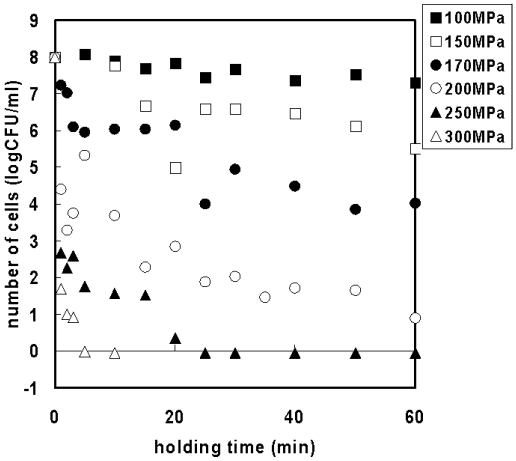


図2306-1　大腸菌 ATCC25922株の高圧不活性化データ

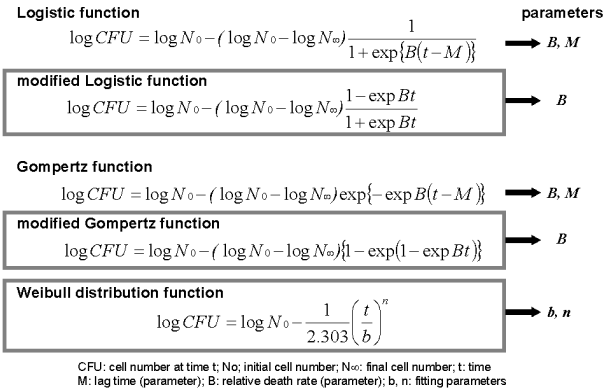


図2306-2　予測微生物学的評価に用いた予測式（枠内）

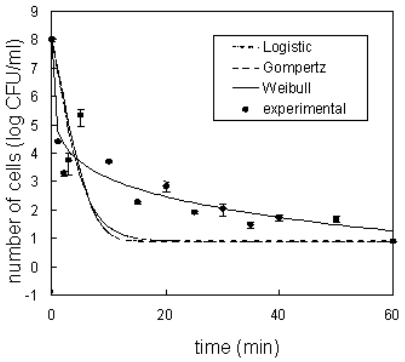


図2306-3　大腸菌 ATCC25922株の高圧不活性化データの各予測式でのフィッティングした例（200MPa）

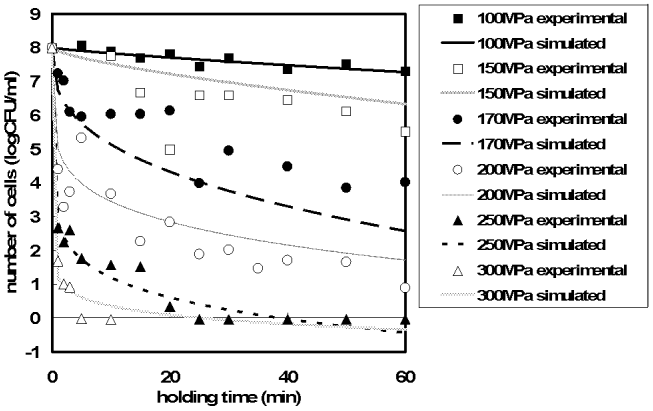


図2306-4　Weibull 関数の変数 b 及び n を補間したシミュレーション

（ｲ）液状食品の高圧処理における予測微生物学的評価

保存菌株の高圧耐性を調べたところ、*Escherichia. coli* O157:H7では MN28株が、*Salmonella* では SE4株が、各々最も耐性が高く、400MPa 以上10分間処理で死滅する大腸菌 ATCC25922株（モデル系菌株）よりも、高圧耐性だった。（図2306-5&2306-6）

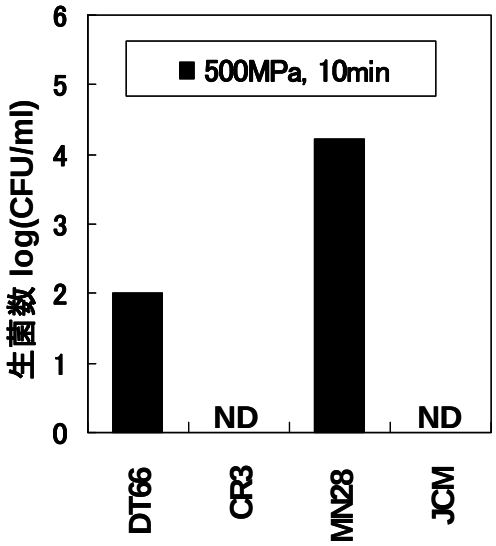


図2306-5　大腸菌 O157:H7からの高圧耐性株の選択。MN28株が最も高圧耐性であった。（ND：不検出）

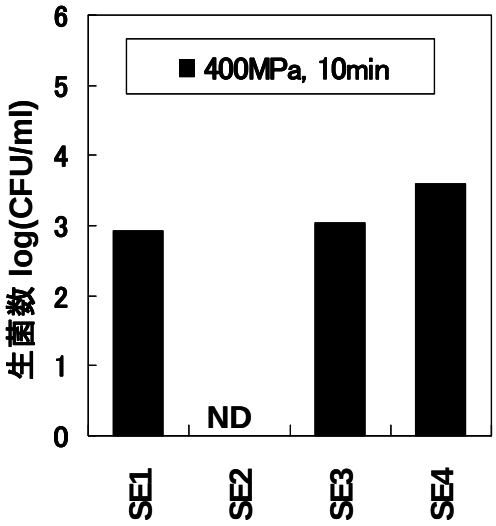


図2306-6　サルモネラからの高圧耐性株の選択。SE4株が最も高圧耐性であった。（ND：不検出）

液卵よりもトマトジュースにおいての殺菌が効果的であり、高圧処理直後の試料保存温度が高い程、病原菌が再活性化しやすい傾向があった。また、液卵においてはサルモネラの方が大腸菌よりも耐性が高いことが示された。（図2306-7&2306-8）

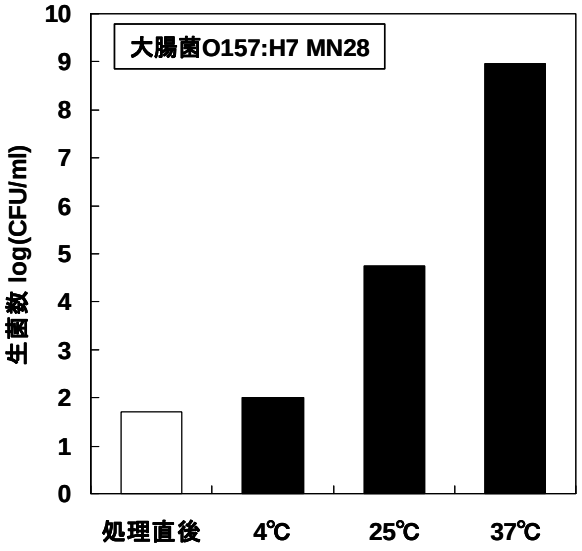


図2306-7　液卵を高圧処理した後の保存温度が大腸菌 O157:H7の再活性化に及ぼす影響。

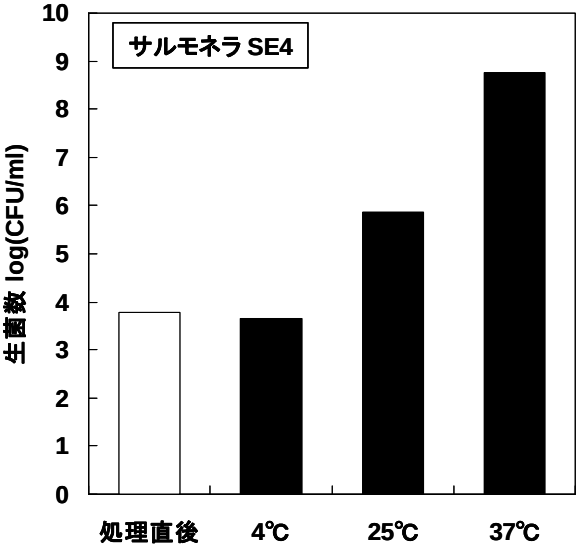


図2306-8　液卵を高圧処理した後の保存温度がサルモネラの再活性化に及ぼす影響。

液卵を異なる温度で高圧処理したところ、高圧処理を高温で行うほど殺菌効率が高い傾向を示した。また、これらデータは、モデル系で良好な記述が可能であったWeibull関数によって、やはり良好に記述されることが示された。（図2306-9&2306-10）

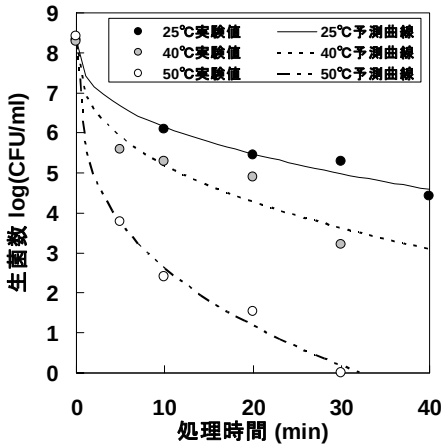


図 2306-9　液卵中の大腸菌 O157:H7 の 350MPa での高圧不活性化に及ぼす温度の影響。

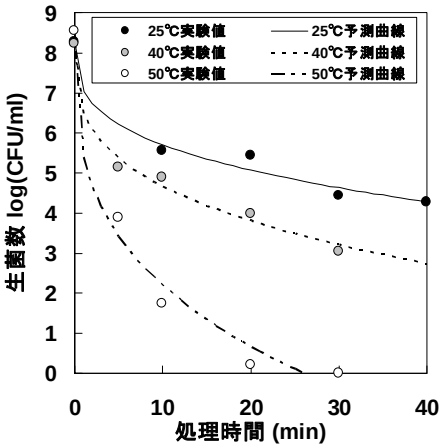


図2306-10　液卵中のサルモネラの350MPa での高圧不活性化に及ぼす温度の影響。

エ　考　察

(ア) モデル系の高圧処理における予測微生物学的評価

他の非熱的殺菌技術のデータも良好に記述できる Weibull 関数は、高圧処理にも適用可能なことが明らかとなった。

(イ) 液状食品の高圧処理における予測微生物学的評価

温度が高い程、高圧処理は有効であったが、液卵では変性に注意する必要があった。Weibull 関数は、液状食品の高圧処理にも適用でき、適用範囲が広いと考えられた。

オ　今後の課題

(ア) モデル系の高圧処理における予測微生物学的評価

各種食品での予測を可能とするため、pH、塩濃度など、他の条件を変化させたモデル条件での実験データを集積する必要がある。損傷、回復の条件を検討する必要がある。

(イ) 液状食品の高圧処理における予測微生物学的評価

モデル系での実験、評価手法開発と併行して、各種食品での高圧処理実験を行い、重要な影響因子を解明しつつ、損傷、回復の視点から保存実験を行う必要がある。

カ　要　約

(ア) モデル系の高圧処理における予測微生物学的評価

大腸菌 ATCC25922株、リン酸緩衝生理食塩水でのモデル系に於いて、高圧処理による微生物の不活性化データを集積し、Weibull 関数が不活性化挙動を記述するのに適した予測式であることと示した。

(イ) 液状食品の高圧処理における予測微生物学的評価

病原菌として、*Escherichia. coli* O157:H7および *Salmonella* の菌株数種から高圧耐性の最も高い菌株をそれぞれ選択して実験に用いた。液状食品の代表としてトマトジュースおよび液卵について、温度が高いほど高圧不活性化を受けやすく、その不活性化挙動が Weibll 関数により良好に記述できることを明らかにした。

キ　引用文献

K. Yamamoto, M. Matsubara, S. Kawasaki, M. L. Bari and S. Kawamoto, Modeling the pressure inactivation dynamics of Escherichia coli, Braz. J. Med. Biol. Res. 38(8), 1253-1257.

研究担当者（山本和貴*、小関成樹）

7　乳頭保護シール施用技術の開発

ア　研究目的

牛乳の品質を向上させ食品の安全性を高めるためには、生産の第一段階となる生乳の品質を良好にすることが重要である。そのためには、搾乳機械や冷却貯留装置の衛生管理の問題ばかりでなく、搾乳時における乳頭の汚れを少なくし、清浄な状態で搾乳する作業条件を整えることが重要な要件となる。しかし、酪農家戸数の減少と飼養頭数規模の拡大が進むとともに、大規模飼養牛舎での乳頭汚れ発生が多く、乳頭洗浄・ふき取りなどの前処理作業の煩雑さと作業時間の増加があらわれている。農場出荷時の生乳細菌数１万/ml 以下の目標が達成できない農場も多く見られる。また、従来搾乳終了後に行われている液状消毒剤による乳頭殺菌作業は、液体を噴霧するか漬浸させるものであり、一時的な殺菌力はあるものの、乳頭の汚れ防止や清浄環境保持の点で改良の余地があると考えられる。そこで、本研究では生乳中細菌数の増大を未然に防止するために、搾乳時の乳頭衛生管理作業の改善を目標とした。具体的には、搾乳と搾乳の間の飼育管理の間に，牛床の汚れやふん尿が乳頭に直接付着しにくい条件を作る方法として制菌作用を持たせたシール資材の利用可能性について検討する。搾乳終了時に施用して、乳頭を物理的に保護するシール資材を試作してこれの性能確認を進める。さらに作業性向上に向けた乳頭保護シール施用方法の開発を行う。

イ　研究方法

乳頭保護シール資材の要件としては、資材の取り扱いが容易で無害であることや使用後に特別な処理が必要でないことなどが考えられ、これらの要件を満たす資材として天然物由来のアルギン酸ナトリウムに着目し、以下について検討を進めた。

(ｱ) 乳頭保護シール資材への殺菌剤添加の影響検討

市販のアルギン酸ナトリウム印象剤に乳頭殺菌用ディッピング剤（ヨウ素、グリセリン等を含有）を混合した場合の皮膜形成性を観察で、殺菌能力を以下の２つの方法で調査した。消毒資材の含有率（有効ヨウ素濃度0.02～0.32%）を変えたシール資材を滅菌シャーレ上でシート状に成形し大腸菌（K12株）溶液を接種後、資材表面を滅菌綿棒で拭き取り、菌数（大腸菌用フィルム培地使用）を調査した。またゴム製模擬乳頭を用いて、大腸菌（K12株）溶液に浸漬後、試作したシール資材を漬浸して皮膜を形成し、1 時間後にシール資材を剥離して乳頭表面の菌数を同様の拭き取り法で調査した。

(ｲ) 実際の乳頭への施用検討

アルギン酸塩の製造メーカより試作シール資材の供給を得て、市販乳頭殺菌用ディッピング剤を添加し、実際の乳牛への施用試験を実施した。施用後の被覆保持可能時間を観察で、清浄度保持能力は滅菌綿棒による拭き取り法で表面の菌数(一般細菌用フィルム培地使用)を調査した。

(ｳ) 施用作業時間延長の検討

施用作業時間を長期にとる方法として、アルギン酸塩基剤とカルシウム剤を分離した２剤施用方式について検討を行った。ミルキングパーラ内で、搾乳後の乳牛に順次施用作業を実施し、施用後の被覆保持可能時間を観察で、清浄度保持能力を滅菌綿棒による拭き取り法で表面の菌数(一般細菌用フィルム培地使用)を調査した。

ウ　研究結果

(ｱ) 乳頭保護シール資材への殺菌剤添加の検討

供試基材20%に対して添加殺菌剤と水を80%の重量割合で攪拌混合すると、ペースト状の資材となり、いずれも皮膜形成が可能で、殺菌剤の配合によるシール資材の皮膜形成阻害は現れなかった。形成された皮膜は室温20℃において約５時間で重量が半減した。なお、市販ディッピング剤を多く配合した資材は粘度が高く気泡に富み、紙コップを用いて模擬乳頭に漬浸することで皮膜厚さが確保しやすく、乾燥後も柔軟性を持つことからシール資材として良好と考えられた（写真2307-1)。

滅菌シャーレにシール資材を形成した調査では、有効ヨウ素濃度0.02%の場合でも400個/cm^2の大腸菌が接種直後に殺菌された。さらに、模擬乳頭における調査でもいずれの有効ヨウ素濃度においても１時間後には乳頭表面の大腸菌は検出されなかった（表2307-1)。

表2307-1　保護シール資材の制菌(模擬乳頭　室温20度)

		試料O	B	C	D
配合割合(%)	アルギン酸印象剤	なし(ポリ袋中で乾燥防止)	20	20	20
	ディップ剤(グリセリン)(有効ヨウ素)		1 (0.2) (0.02)	4 (0.8) (0.08)	16 (3.2) (0.32)
	水		79	76	64
K12カウント数 *(CFU/cm^2)	①接種直後	4.3 (4.1×10^{4}個/cm^2)			
	②1時間後	3.0	ND	ND	ND

①滅菌模擬乳頭に大腸菌培養液(濃度10^{8}個/cc)を浸漬しふき取り調査した値。
②上記大腸菌を浸漬させた模擬乳頭にヨード配合割合の異なる保護シール剤をディップし、1時間後にはがして乳頭表面の菌数をみる。
＊10のべき乗表示

写真2307-1　漬浸 1 時間後に剥がした状況(試料 D)

(イ) 実際の乳頭への施用検討

紙コップを用いて実際の乳頭に施用した(写真2307-2,3)。試作シール資材A群(施用可能時間が短時間のもの)でディッピング殺菌剤添加重量割合3-7%（有効ヨウ素濃度0.06-0.14%)）の乳頭清浄度保持能力を見ると、清拭後の乳頭表面の一般生細菌数が3.6±0.6log CFU/cm^{2}に対して、施用後2-5時間経過後に被覆を剥がして計測した乳頭表面の一般生細菌数が2.8±0.7log CFU/cm^{2}となり、両者の間に有意差が認められた（表2307-2)。

写真2307-2　紙コップによる乳頭施用

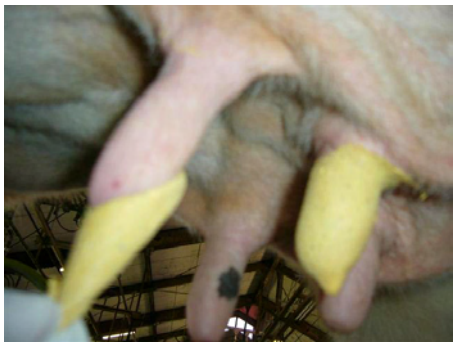


写真2307-3　乳頭皮膜とはがし作業

表2307-2　資剤A群の乳頭表面の制菌効果

		乳頭表面の一般生細菌数 (av±sd、log CFU/cm^2)
温水清拭ふき取り作業後 (n=14)		3.6^a±0.6
清拭作業2-5時間後	施用乳頭(n=12)	2.8^b±0.7
	無被覆乳頭(n=8)	4.0^a±0.5

乳頭表面を綿棒でふき取り、施用乳頭はｼｰﾙを剥がしてふき取り
＊　n:調査乳頭数　、a,b　異符号間に1%水準で有意差あり,
＊＊　ﾃﾞｨｯﾌﾟ剤3-7%添加(有効ヨウ素濃度0.06-0.14%)

試作シール資材Ｂ群（施用可能時間長時間のもの）は、時間経過による重量減少量が少なく24時間経過後にも当初重量比30％を保ち柔軟性・保湿性が高まった。　搾乳牛への施用（有効ヨウ素濃度0.08％添加）後5時間経過後の乳頭表面生細菌数は、剥れの発生がない場合には、試作シール資材Ａ群と同様に施用前に対して有意に低下した（表2307-3）。

表2307-3　試作資材Ｂ群の制菌効果

		乳頭表面の一般生細菌数 (av±sd、log CFU/cm^2)
搾乳牛施用前(n=31)		3.3^a±0.6
施用5時間後調査	施用乳頭(n=13)	2.7^b±0.5
	施用後剥れ乳頭(n=19)	3.7^c±0.4

乳頭表面を綿棒でふき取り、施用乳頭はｼｰﾙを剥がしてふき取り
＊　n:調査乳頭数　、a,b,c　異符号間に1%水準で有意差あり,
＊＊ ﾃﾞｨｯﾌﾟ剤4%添加（有効ヨウ素濃度0.08%）

しかし、消毒剤・水と混合後のシール資材の施用可能時間は10～15分程度にとどまり、作業時間の延長についてさらに検討を進める必要があった。また、5時間経過後にシール剥れの発生した乳頭割合は搾乳牛では６割近くとなり、作業性と剥がれ発生比率の点で更なるシール資材改良を進めることが必要であった。

(ｳ) 施用作業時間延長の検討

カルシウム剤を別剤とする２剤施用方式（試作シール資材Ｃ群）としたことにより、攪拌混合後10-15分の間に行わなければならなかった施用時間の問題が解消され、搾乳作業時間を通して消毒剤と水で攪拌混合したシール資材を容器から供給し（写真2307-4）これをカルシウム剤でゲル化促進する（写真2307-5）作業法の適用が可能となった。

写真2307-4　キャップ容器での施用

写真2307-5　スプレー噴霧

この方法でのシール被覆率（施用後の被覆維持乳頭数/施用乳頭数の百分率%）は施用2.5-3h 後までは80%程度の値が得られたが、5.5h 経過後には65%程度まで低下した（図2307-1）。

被覆乳頭の乳頭表面細菌数は施用5.5h 経過後でも10^3(CFU/cm^2)台に留めることが出来、被膜による制菌効果については１剤方式の場合と同様の結果となった（表2307-4）。

エ　考察

アルギン酸塩を用いた乳頭保護シール資材の乳頭清浄維持機能を確認し、従来にない特長を有する資材と考えられた。さらに２剤施用方式とすることにより施用可能時間の問題について一つの回答を得ることができ、搾乳後の乳頭について殺菌と表面汚れ防止を図る作業法が提示された。起立横臥動作に伴う乳頭からのシール資材剥がれの発生防止について

は限界がみられ、搾乳と搾乳の間の全時間の乳頭保護はアルギン酸塩を基剤とした場合、困難と考えられた。施用後２時間程度は乳頭被覆が８割以上保たれることが明らかになった。それ故、従来、問題とされている搾乳終了直後の乳頭管弛緩時間帯における乳頭端からの細菌感染予防、物理的保護と表面汚れ防止が可能であり、一定の効果が発揮できる資材と作業法であると考えられた。

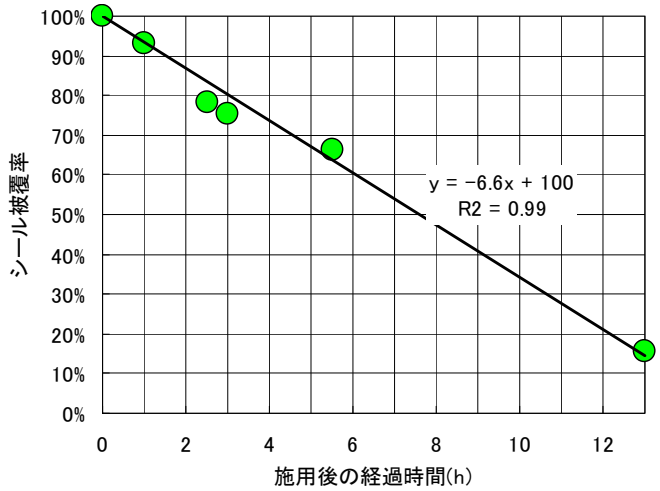


図2307-1　２剤方式(資材Ｃ群)施用後の被覆率の変化

表2307-4　２剤方式（資材Ｃ群）での制菌効果

	シール被覆乳頭 (n=8)	シール被膜無し乳頭 (n=8)
乳頭表面の好気性細菌数 (av±sd、logCFU/cm^2)	3.3^a±0.6	4.8^b±0.8

施用5.5時間後の乳頭について綿棒拭き取り調査、被覆乳頭はシールを剥がして調査
n:調査乳頭数、a,b 異符号間に1%水準で有意差あり、ディップ剤4%添加(有効ヨウ素0.08%)

オ　今後の課題

開発したシール資材は、シール資材の改良と２剤方式の採用により、作業性改善は進んだもののシール被覆保持時間には限界が見られた。今後は、シール資材そのものについても、液だれが少なく施用が容易な資材開発を進める必要がある。さらに、より作業性の高い乳頭施用具の開発を進めることにより、搾乳後施用による乳頭の保護機能の向上を図り、生乳の品質確保を可能とする新しい乳頭衛生管理技術提示の方向を検討する。

カ　要　約

アルギン酸塩を用いた乳頭保護シールの乳頭清浄維持機能を確認し、さらに２剤施用方式とすることにより施用可能時間の問題が解消され、搾乳時の乳頭管理作業に採用が可能な作業法が提示された。起立横臥動作に伴うシール剥がれの発生が見られ、搾乳と搾乳の間の全時間の乳頭保護は困難であったが施用後２時間程度は乳頭被覆が8割以上保たれることを明らかにした。それ故、従来特に問題とされている搾乳終了直後から1-２時間の乳頭管弛緩時間帯における乳頭の物理的保護と細菌感染予防に効果がある資材として利用性がある。

キ　引用文献

国内学会発表：

1）長谷川三喜、本田善文、市来秀之、「乳牛用乳頭保護シール資材の検討」、第59回関東畜産学会大会講演要旨、14、2004

雑誌：

1）長谷川三喜、本田善文、石田三佳、市来秀之　「搾乳作業とミルカーにおける乳房炎防止方法の試み」　獣医畜産新報 vol59. No6、463-467、2006

研究担当者（長谷川三喜*、石田三佳、市来秀之、本田善文）

8　バイオフィルム分解酵素による食中毒菌除去法の開発

ア　研究目的

食品の安全性は国際的に重大な関心事になっており、生産から消費者の口に入るまでの徹底した衛生管理が望まれている。その対策としての研究も数多く行われている。しかしながら *E. coli* O157による食中毒感染事例をみても、その数は依然として減少していない。

近年の研究で微生物は様々な物に付着するとバイオフィルムと呼ばれる多糖を中心とした粘物質を菌体外に形成し、バイオフィルム中の微生物は抗生物質、薬剤、乾燥等に対し、浮遊状態に比べ著しく高い抵抗性を示すことが明らかに成ってきたが、バイオフィルムの形成機構は不明な点が多く、一度形成されたバイオフィルムを完全に取り除く有効な方法は現時点では開発されていない。現在の生食志向型食生活においては、ますますバイオフィルム形成による食中毒リスクが高くなってきている。

そこで、本研究ではバイオフィルム除去効果のある酵素のスクリーニングを行い、安全で消費者レベルでも簡便に行うことができる新たな食中毒菌の除去方法を確立する事を目的とする。

イ　研究方法

(ｱ) 大腸菌 O157のモデル系におけるバイオフィルム形成法を確立するために、培地濃度、pH を変えて大腸菌 O157を培養した。

(ｲ) 麹菌、キノコ等の食用菌を大腸菌 O157のバイオフィルム等の様々なインデューサーを含む培地で培養し、粗酵素液を得た。

(ｳ) 市販酵素製剤及び上記酵素による大腸菌 O157のバイオフィルム除去能及び形成抑制能の検定を行った。

ウ　研究結果

(ｱ) 実験方法と結果の関係をスキームとして纏めた(図2308-1)。

(ｲ) バイオフィルム形成の条件検討。大腸菌 O157 DT66株は DEM 培地・pH 4 においてバイオフィルムを良く形成した(図2308-2)。

(ｳ) 酵素によるバイオフィルム形成の抑制。市販の酵素製剤のいくつかはバイオフィルムの形成抑制効果を示した(図2308-3)。

(ｴ) 酵素によるバイオフィルムの分解。O157 DT66株のバイオフィルムを誘導物質とした食用菌－1 及び食用菌－2 の培養液により、バイオフィルム除去効果が観察された(図2308-4)。

エ　考　察

(ｱ) バイオフィルム形成条件

大腸菌 O157の種類により、バイオフィルム形成能に違いが観察された。中性付近より酸性側の pH でバイオフィルムが良く形成される傾向が見られた。

(ｲ) 酵素によるバイオフィルム形成の抑制

セルラーゼ、キシラナーゼとして販売されている市販の酵素製剤の多くはバイオフィルム形成を抑制したが、特定の酵素活性が有効な効果を示すことは無く、酵素や由来に共通性は見いだせなかった。

(ｳ) 酵素によるバイオフィルムの分解

大腸菌 O157のバイオフィルムを誘導物質とした際のみにバイオフィルム除去効果がある酵素の誘導が観察されたことから、大腸菌 O157は比較的分解しにくい構造をしたバイオフィルムを形成することが予想された。

オ　今後の課題

(ｱ) バイオフィルム形成条件

諸処の条件でバイオフィルム形成能に大きく違いが見られることから、バイオフィルム形成に関与する因子を明らかにする必要がある。また、バイオフィルム形成が起こる場についても検討が必要である。

(ｲ) 酵素によるバイオフィルム形成の抑制

バイオフィルム形成抑制効果のある酵素を特定する必要がある。

(ｳ) 酵素によるバイオフィルムの分解

大腸菌 O157のバイオフィルムの構造を明らかにすると共にバイオフィルム除去能のある酵素製剤を開発する必要がある。

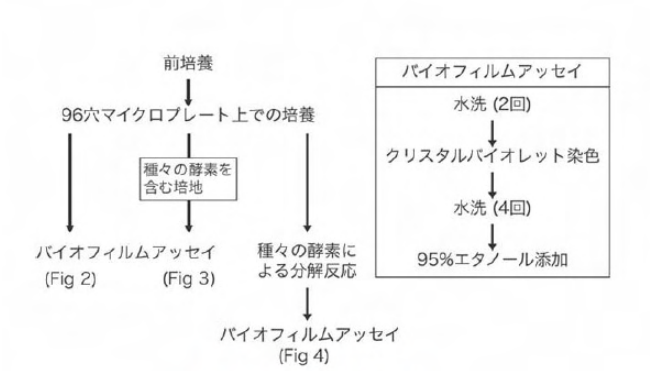


図2308-1　実験スキーム

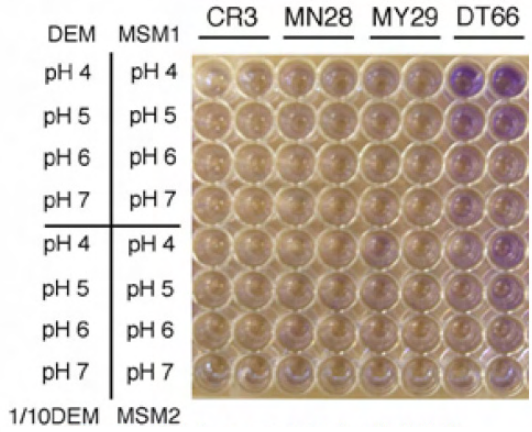


図2308-2 **バイオフィルム形成の条件検討**

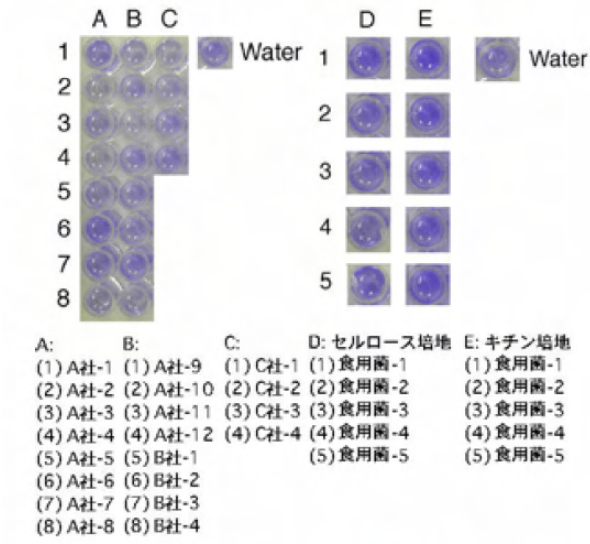


図2308-3　バイオフィルム形成過程における酵素添加の影響

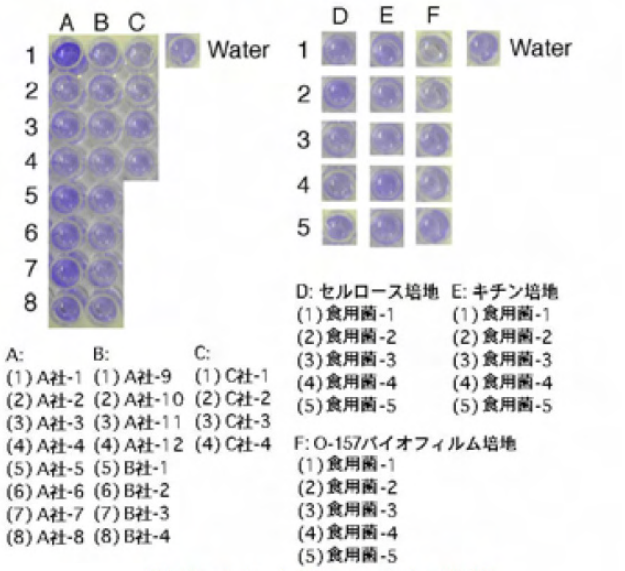


図2308-4　酵素によるバイオフィルムの分解

カ　要　約

バイオフィルム形成条件、酵素によるバイオフィルム抑制効果、酵素によるバイオフィルム除去効果を検討した。大腸菌 O157 は pH 4においてバイオフィルムを良く形成した。市販の酵素製剤のいくつかはバイオフィルムの形成抑制効果を示し、 2 種類の食用菌がバイオフィルム除去効果のある酵素を生産した。

研究担当者（金子　哲*）

9　予測微生物学的解析を用いた食品加工機器表面における微生物制御技術の開発

ア　研究目的

食品加工機器の不十分な洗浄は、機器表面上における微生物の増殖を誘引し、交差汚染を引き起こす原因となり得る。実際、不十分な洗浄が原因で食品事故を引き起こした事例は少なからず報道されている。このような食品事故を防ぐためには、食品加工機器の洗浄を徹底することが第一義的に重要である。しかし、その一方で、万が一洗浄不良が起きた場合の影響を予測可能にし、その対策を立てておくことも食品製造工程のリスク管理上極めて重要である。そのためにはまず、食品加工機器および食品容器の表面に残存または付着した微生物の各種条件下における生存状況を把握することが必要となる。

食品機器などの固体表面における微生物の生存状

況に関しては、これまで、いくつかの研究例が報告されている。その多くは、微生物懸濁液で汚染した固体表面を検討対象として、固体表面上の生菌数の経時変化を調べたものである。このように懸濁液として微生物を塗布した場合には、時間の経過とともに表面の乾燥が進行する。水分は微生物の生育にとって重要な因子であり、このような表面の乾燥に伴って微生物の生存状況に変化が生じる可能性がある。にもかかわらず、これまでの研究では、表面上に残存する水の量を測定した例はなく、したがって含水率変化と生菌数変化との関係は明らかになっていない。

本研究では、不十分な洗浄後によってもたらされる食品機器の微生物汚染リスクの評価と微生物制御方策の検討を最終目的としつつ、その手始めとして、水分と有機物の残る固体表面上に微生物が残存あるいは付着した場合について、表面の乾燥が進行する過程における生菌数の変化を検討した。特に、生存率に加えて含水率の変化も測定し、両者の相関について検討した。表面素材の例として食品容器やまな板等に使用されるポリプロピレンを、微生物として大腸菌 K-12株（*Escherichia coli* NBRC3301）を用いた。また、共存有機物としては Luria-Bertani（LB）培地を用いた。大腸菌の生存状況は共存有機物の種類にも依存すると考えられるが、大腸菌の生育に必要な栄養素を豊富に含む LB 培地を用いての実験結果は、微生物汚染リスクという観点での最悪の事態の一例として評価できる。

なお、本研究は平成17年度より開始した。したがって、本稿は1年間の研究成果をまとめたものであることを付記しておく。

イ　研究方法

(ア) 供試表面

市販のポリプロピレン板を50×50mm の大きさに裁断してテストピースを作成した。テストピースは、アルカリ洗剤（Cica Clean MI，関東化学）と水で順に洗浄した後、70%エタノール中に保存し、実験に使用する直前にクリーンベンチ内で UV 照射しつつ乾燥させた。

(イ) 供試表面上での大腸菌の生存状況

10mL の LB 液体培地（trypton 10g/L，yeast extract 5g/L，NaCl 10g/L）に *E. coli* NBRC3301を一白金耳接種して37℃で24時間培養した。このようにして得られた定常期の大腸菌培養液を1000倍に希釈した。この際の希釈液として、生理食塩水（実験 S）、LB 培地（実験1LB）、濃度を5倍および10倍にした LB 培地（実験5LB および10LB）のいずれかを用いた。実験 S は共存する有機物のない場合、実験1LB、5LB、10LB は水分含量の異なる共存有機物がある場合を想定した実験区である。希釈した大腸菌懸濁液0.1mL（2〜5×10^4cfu）を複数のテストピースに塗布し、クリーンベンチ内で0〜48時間放置した。放置後の各テストピースについて、その表面を滅菌綿棒で拭取り、平板培養法によって生存菌数を測定した。

上記のほか、質量既知のテストピース 1 枚に上記と同様に希釈大腸菌懸濁液0.1mL を塗布し、質量を経時的に測定した。さらに、48時間経過後のテストピースを減圧乾燥して表面上の固形分の質量を求めた。これらの測定値より、各時点におけるテストピース上残存物の含水率（固形分基準）を求めた。

ウ　研究結果

(ア) 有機物の存在しないポリプロピレン表面上での大腸菌の生存状況

ポリプロピレン製テストピース上に塗布された大腸菌を共存有機物の無い状態で（生理食塩水中に懸濁して）放置した場合、表面の乾燥の進行につれて大腸菌は死んでいく。平均14℃の室内で放置した場合の結果を例として図2309-1に示す。図2309-1（b）に示すように、テストピース上の水分はほぼ一定の速度で減少を続け、12〜24時間でほぼ乾燥した状態に達した。この乾燥過程における大腸菌の死滅は、図2309-1（c）に示すように、一次反応速度論で近似可能であり、死滅速度定数は0.18h^{-1}であった。なお、30℃以下の範囲では、このような乾燥進行中の表面における死滅速度定数は温度の高い方が表面上における死滅速度定数は大きかった。また、同温の生理食塩水中における死滅速度定数に比べて大きかった。したがって、大腸菌の死滅過程に対する乾燥速度の影響の大きさが示唆された。

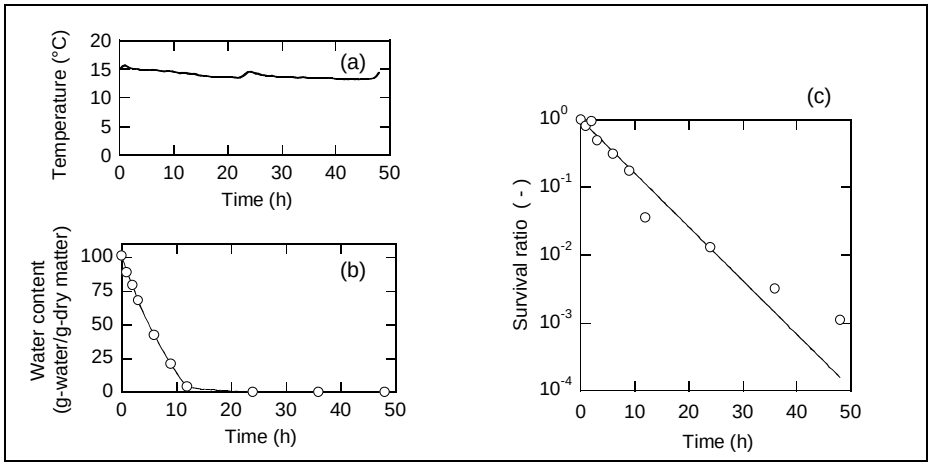


図2309-1　生理食塩水存在下でポリプロピレン表面に塗布した大腸菌の生存経過　(a) 温度 (b) 含水率 (c) 生存率

(ｲ) 有機物の共存するポリプロピレン表面上での大腸菌の生存状況

LB 培地成分が共存するポリプロピレン表面上に大腸菌を室温で放置した場合の結果を図2309-2に示す。実験1LB、5LB、10LB のいずれの場合においても、図2309-2(b)に示すように、実験開始とともに水分は減少を続け、約12時間で平衡含水率に近い状態に達した。また大腸菌の死滅経過は、図2309-2(c)に示すように、実験初期に生菌数が維持される（あるいはわずかに増加する）期間が存在し、次いで致死に転じた。致死に転じるまでの時間は共存有機物濃度に依存した。また、いずれの場合も48時間後において大腸菌は完全に死滅することはなく、24時間以後の生存率は共存有機物が多いほど高い傾向を示した。

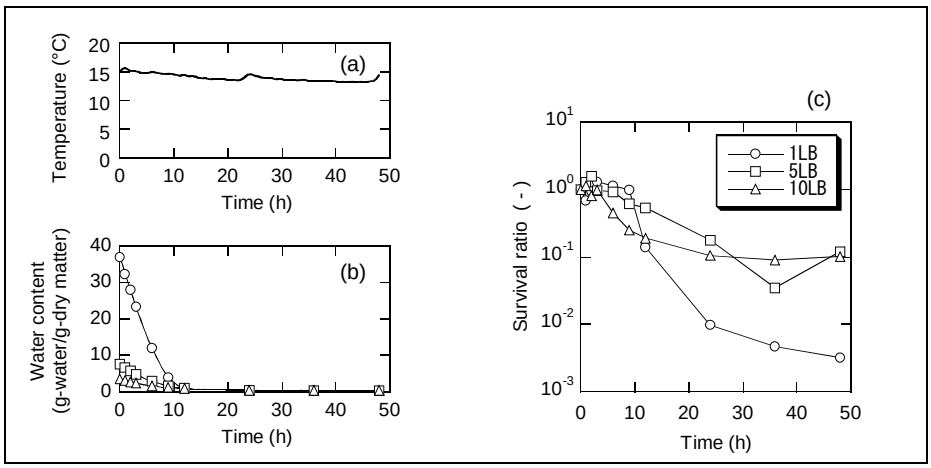


図2309-2　各種濃度の LB 培地と共存させた場合の大腸菌の生存経過
(a) 温度 (b) 含水率 (c) 生存率

実験1LB、5LB、10LB の 3 つの実験区については、いずれも固形分組成は同じであり、水分含量が同じならば、残存物の量は異なるものの、残存物の組成は水分も含めて全く同じになる。したがって、生菌数減少経過が水分含量に依存している可能性が考えられた。そこで、図2309-2に示す実験結果をもとに、各時点における生存率と含水率との相関をとると、図2309-3に示す結果が得られた。この結果より、いずれの実験区においても乾物基準の含水率が3～4を下回った時点から生存率の減少が始まったことがわかる。

有機物が共存する場合、図2309-2 (c) から明らかなように、死滅過程全体を一次反応速度論で記述することはできない。そこで、死滅速度定数に相当する比死滅速度を各時点で概算した。ここで比死滅速度は、時間 t における生菌数を N とおくと、

$-(\mathrm{d}N/\mathrm{d}t)/N$と定義される。図2309-4に結果を示す。固形分基準の含水率が4以下の範囲で比死滅速度の値は概ね$10^{-1}h^{-1}$と近似できることがわかる。ただし、乾燥の進んだ実験終期には、比死滅速度の値の実験区による差が大きくなったが、その値は全般に減少する傾向にあった。図2309-4に示す実線のように死滅速度定数の水分含量依存性を数式モデル化し、実験5LB および10LB の場合について、増殖から致死に転じて以降の生菌数減少過程を Runge-Kutta 法により計算機上でシミュレーションを行ったところ、図2309-5に示すように実験データと比較的良い一致を示すことが示された。

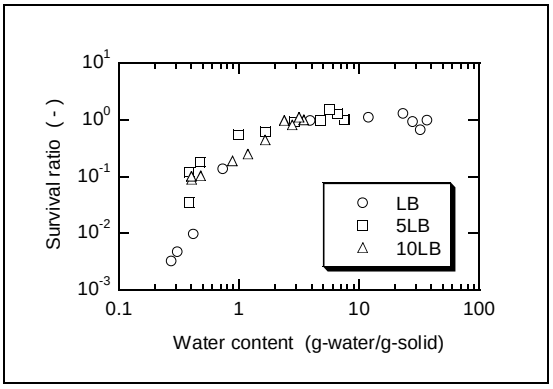


図2309-3　大腸菌生存率の含水率依存性

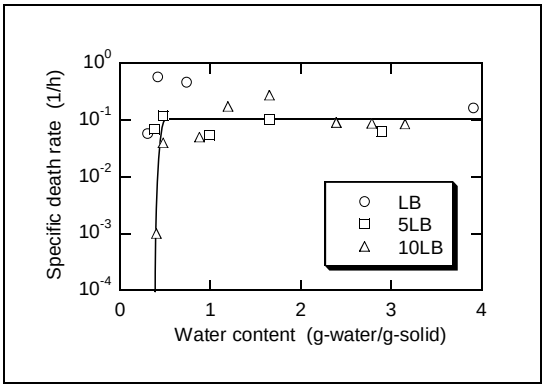


図2309-4　比死滅速度の含水率依存性

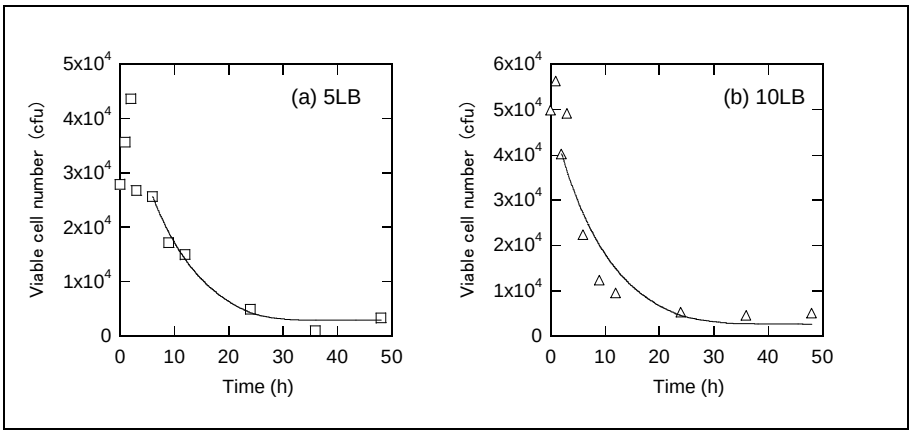


図2309-5　ポリプロピレン表面上の大腸菌生存状況のシミュレーション結果（実線）と実測値（□、△）の比較

エ　考　察

(ｱ) 大腸菌の固体表面上での生存について

上記のように、共存有機物の多寡にかかわらず、48時間では大腸菌が完全に死滅することはなく、24時間以後の生存率は共存有機物が多いほど高い傾向を示した。Wilks ら（2005）は *E. coli* O157の培養液をステンレス鋼表面上に塗布して20℃にて放置した場合の生菌数変化を検討し、生存率が 2 日後に10^{-5}に減少した後は、28日後までほとんど変化しないという結果を得ている。Milling ら（2005）も、生理食塩水で懸濁した *E. coli* pIE639のポリエチレンチップ上で21℃にて放置した場合の生菌数変化を検討し、生存率が 2 日後に10^{-2}程度に、6 日後に10^{-3}程度に達するという結果を得ている。本研究の結果もあわせると、一般に乾燥に弱いと言われる大腸菌ではあるが、固体表面上に残存した場合には相当の期間生存し得ると言える。

(ｲ) 比死滅速度の水分含量依存性について

実験5LB および10LB の場合については、比死滅速度を水分含量の関数として表すことができた。すなわち、初期水分含量がある程度低い場合には比死滅速度が水分含量で整理可能であった。しかし、実験1LB のように初期水分含量が高い場合には、同じ水分含量のみの関数で比死滅速度を近似することはで

きなかった。これは乾燥履歴の影響が大きいためと考えられる。Welsh・Herbert（1999）は、浸透圧の上昇で誘導されるトレハロースの蓄積によって大腸菌の乾燥耐性が向上することを報告している。初期含水率が低い場合には、トレハロースが実験早期に蓄積され、速く高浸透圧環境に適応するのかも知れない。

オ　今後の課題

今後は、数種の微生物・有機物（食品）・表面材質の組合せに対し、異なる環境条件のもとで微生物の生菌率変化を測定し、各々の因子の影響を反映可能な数学モデルを選定・開発することが必要である。このようなモデルの構築は、表面の初期状態や保管条件と微生物生育状況との関係の把握を可能とし、微生物汚染リスクの評価に必要というだけでなく、機器表面上での微生物の増殖抑制や致死促進に貢献する表面条件および環境条件の解明につながるものと期待される。

カ　要　約

本研究では、水分と有機物の残るポリプロピレン表面上に微生物が残存あるいは付着した場合について、表面の乾燥が進行する過程における生菌数変化と含水率の相関について検討した。その結果、共存有機物の多寡にかかわらず、48時間まで大腸菌が完全に死滅することはなく、24時間以後の生存率は共存有機物が多いほど高い傾向を示した。また、初期水分含量がある程度低い場合には、比死滅速度が水分含量の関数として表すことができ、増殖から致死に転じて以降の死滅過程の計算機シミュレーションが可能であった。しかし、初期水分含量が高い場合には、同じ水分含量のみの関数によって比死滅速度を近似することは困難であった。なお、共存有機物が無い場合の致死過程は一次反応速度論で近似可能であった。

キ　引用文献

Milling, A.・Kehr, R.・Wulf, K・Smalla, K. 2005. Survival of bacteria on wood and plastic particles: dependence on wood species and environmental conditions. Holzforschung. 59, 72-81.

Welsh, D. T.・Herbert, R. A. 1999. Osmotically induced trehalose, but not glycine betaine accumulation promotes desiccation tolerance in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 174, 57-63.

Wilks, S. A.・Michels, H.・Keevil, C. W. 2005. The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. Int. J. Food Microbiol. 105, 445-454.

研究担当者（崎山高明*、渡辺尚彦）

10　食品とその製造環境の殺菌における細菌死滅のデータベース化およびグローバル予測理論の構築とその応用

ア　研究目的

加熱加工食品では加熱殺菌工程の効果の評価や予測が重要視され、死滅データベースの充実化が要求されるようになってきている（Jagannath and Tsuchido 2003, 土戸ら 2004a）。この研究では、主に低温加熱殺菌のモデルとして大腸菌、高温加熱殺菌のモデルとして枯草菌胞子を用い、発育温度、加熱温度、回復温度や加熱時 pH を変化させて熱死滅挙動のデータを収集してデータベースを作成するとともに、大腸菌の熱死滅への各過程における影響因子と食塩の効果を調査し、フランス・アメリカの研究機関と協力してグローバルなデータベースネットワークを構築すること、さらにそれらの結果を用いて予測モデルを構築し、実用的な食品殺菌工程の効果予測に適用することを目的とする。また、薬剤殺菌における実用的処理条件の基礎知見を導出するために、薬剤死滅のデータベースの構築にも着手することとした。

イ　研究方法

(ｱ) 大腸菌の熱死滅実験

大腸菌（*Escherichia coli*）OW6株を EM9培地中、各温度で対数増殖期（OD_{650}=0.3）まで培養、集菌後、50mM リン酸緩衝液（pH7.0；以下 KPB）で洗浄、同緩衝液に再懸濁した。0℃で予備保温後、10倍希釈法で所定温度に加熱した。加熱中、試料を採取し、KPB で希釈後、EM9平板上にプレーティングし、各温度で培養した。培養日数は温度によって変動させ、十分なサイズのコロニーを形成させた後それらを計数した。また、食塩の生育、加熱、回復における存在が熱死滅データに与える影響について発育遅延解析法（Takano and Tsuchido 1982）によって評価した。生存曲線から D 値（分）を求め、さらに熱耐性曲線から z 値（℃）を計算した。また、なお、生存曲線が非対数的曲線の場合は直線部の外挿と y 切片との交点から log N_i を求めるか、Weibull モデルによって曲

線を表した。

(ｲ) *Bacillus* 属胞子の死滅実験

枯草菌（*Bacillus subtilis*）168胞子を $MnCl_2$含有 NB2 培地中、各温度で形成させ、集胞子後リゾチーム処理し、繰り返し洗浄後滅菌水に懸濁し、-84℃で凍結保存した。加熱処理は保存胞子を各 pH の KPB を含む試験管に懸濁後、ブロックヒーター中、各温度で加熱した。処理後適宜希釈し、NA 平板上に塗抹し、37℃でコロニー形成させた。また、胞子の過酢酸処理については本菌のほかに、*Bacillus licheniformis* NBRC12200と *Bacillus cereus* NBRC13494を供試した。これらの胞子は緩衝液中、37℃で処理し、平板法によって生存数を評価した。

(ｳ) 死滅データベースの構築と予測モデリング

以上のデータを、過去の文献データベース作成と同様の要領で熱死滅実験データベース（ThermoKill Database E）（土戸ら 2004b）に追加入力した。また、得られたデータをもとに死滅予測のためのグローバルモデリングを行った（Legeurinel and Mafat 2004）。薬剤殺菌のデータについては薬剤死滅データベース（ChemoKill Database E）（土戸ら 2004b）に追加入力した。

ウ　研究結果

(ｱ) 大腸菌の熱死滅に対する発育温度、加熱温度、回復温度および各過程における食塩存在の影響の解析とデータ入力

各発育温度、加熱温度、回復温度で大腸菌の pH7.0 の熱死滅データを取得した。これらの結果を一例として52℃での D 値は4.27分であり、31℃で回復させたときの4.64分より低かった。これらの結果から回復温度の最適は増殖よりも少し低く、30℃付近で最大の耐熱性を示した。得られた各温度での D 値をもとに各温度で生育した大腸菌の熱耐性曲線を各回復温度について作成した。得られた直線の傾きから z 値を求めたところ、この値は発育温度の上昇とともに低下の傾向にあり、回復温度についてはあまり依存しなかった。

食塩の影響解析については、食塩の加熱とその前歴・後歴の影響についての検討では、加熱時の食塩濃度は熱死滅にあまり影響を与えなかったが、生育時(G)、集菌後保温時(B)、加熱時(H)、加熱後保温時(A)、回収時(R)の各過程における食塩（3%）の影響について調べた結果、これらの各組み合わせ条件の検討結果、以下の特徴的な傾向が認められた。3%食塩の存在は、培養時および加熱時では耐熱性を高め、加熱前保温および加熱後保温へのショックは細胞を殺滅させた。回復培養時には死滅を促進したが、適応細胞ではあまり変化しなかった（表2310-1）。

表2310-1　大腸菌の52℃での熱死滅に対する各過程における食塩（3%）存在の影響

NaCl (%) = G-B-H-A-R	D 値 (min)	log Ni	NaCl (%) = G-B-H-A-R	D 値 (min)	log N_i
0-0-0-0-0	4.38	-1.10	3-0-0-0-0	9.02	-1.59
0-0-0-0-3	3.51	-0.36	3-0-0-0-3	5.29	-1.79
0-0-0-3-0	3.86	-1.61	3-0-0-3-0	8.20	-1.96
0-0-0-3-3	2.31	-0.22	3-0-0-3-3	3.20	-0.42
0-0-3-0-0	4.83	-1.01	3-0-3-0-0	9.66	-0.90
0-0-3-0-3	4.14	-1.19	3-0-3-0-3	9.23	-0.84
0-0-3-3-0	10.82	-0.36	3-0-3-3-0	16.13	-0.84
0-0-3-3-3	11.64	-0.26	3-0-3-3-3	14.77	-0.67
0-3-0-0-0	3.68	-1.52	3-3-0-0-0	2.53	-1.08
0-3-0-0-3	4.47	-1.99	3-3-0-0-3	2.56	-1.87
0-3-0-3-0	2.06	-0.87	3-3-0-3-0	2.65	-0.55
0-3-0-3-3	1.30	-1.25	3-3-0-3-3	2.44	-2.40
0-3-3-0-0	3.29	-1.25	3-3-3-0-0	5.25	-1.33
0-3-3-0-3	1.69	-0.81	3-3-3-0-3	6.05	-1.48
0-3-3-3-0	4.02	-0.92	3-3-3-3-0	5.51	-0.92
0-3-3-3-3	5.39	-0.91	3-3-3-3-3	7.46	-1.02

D 値は90%死滅時間、log Ni およびアルファベット（G、B、H、A、R）は本文参照。

(ｲ) 枯草菌胞子の熱死滅および *Bacillus* 属細菌胞子の過酢酸による死滅における影響因子の解析とデータ入力

枯草菌の37℃で形成した胞子の pH7.0、92℃での熱死滅経過はほぼ直線となり、D値は24.8分であった。各 pH、温度で加熱した場合のD値を収集した。さらに、熱耐性曲線を作成し、z 値を求めた。また、枯草菌、*B. licheniformis*、*B. cereus* に対する過酢酸の殺菌作用のデータを取得し、結果を図2310-1に示した。

(ｳ) 大腸菌および枯草菌胞子の熱死滅データのグローバルデータベース化と予測モデリング

得られた熱死滅データを、作成中の熱殺菌データベース、ThermoKill Database E に追加した。さらに、大腸菌の熱死滅において調査した発育温度 T″（19~37℃）、加熱温度 T（50~54℃）、回復温度 T’（19~37℃）の3因子について線型重回帰多項式モデルを用いて解析し、以下の予測式を得た。

$$\log D = 12.010 + 0.03\,T'' - 0.252\,T + 0.109T' - 0.002T'^{2}$$

次数の異なるもの、また因子間の相互作用を考慮したものと考慮しないものの双方についても検討したが、発育温度と加熱温度については1次、回復温度については 2 次で近似でき、相互作用を考慮しないモデルでも十分に良い予測値と実測値との間によい相関が得られた（相関係数 R^2は0.974)。

上記の線形予測モデルとは別に、種々の因子間の補正モデルも提出した。このモデルでは、基準加熱温度を60℃、z 値を5℃、基準 D 値を0.1分、として熱耐性曲線の式を変形した基準熱耐性曲線式、log D = 0.2 T +11を設定した。そして種々の影響因子が変動した場合にこの基準式との変化の挙動を表す指標として、log D = 0.2（T－α）+(11－β)を提示し、補正係数、α値とβ値を定義した。データは省略するが、各試験条件におけるαとβ値を求めた。

枯草菌の熱死滅における調査したそれぞれ3因子（胞子形成温度, T″：19, 25, 30, 37℃；加熱温度, T：86, 89, 92, 95, 98℃；加熱時 pH：6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0）について線型重回帰多項式モデルを用いて解析した。また、このモデルの予測値の実測値への適合性を評価した。

$$\log D = 9.768 - 0.531\,T'' - 0.095\,T + 1.828pH + 0.009\,T''^{2} - 0.116pH^{2} \quad (R^2 = 0.943)$$

大腸菌の熱死滅についてはフランスのグループと共同研究により、非直線性を考慮して Weibull モデルを併用した線型 Bigelow モデル（グローバルモデル）を提示した。このモデルでは発育温度の影響は無視できる結果となり、また、その予測値と実測値との関係を図2310-2に示した。

$$\log D = \log D^{*} - \left(\frac{T - T^{*}}{z_T}\right) - \left(\frac{T' - T_{opt}'}{z_T'}\right)^{2}$$

ここで、T*は50℃、D*は11.9分、T_{opt}は25.8℃、z_Tは4.0℃、$z_{T'}$は15.3℃、相関係数 R は0.75であった。

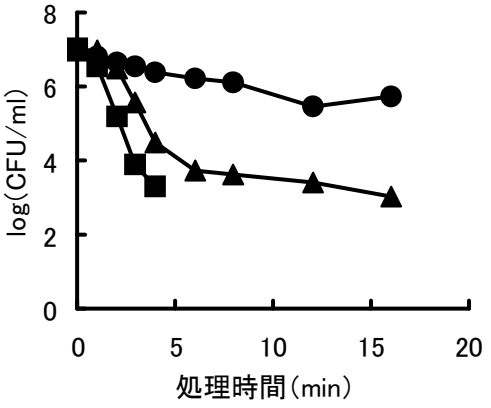


図2310-1　*Bacillus*属細菌胞子に対する過酢酸(100ppm)の殺菌作用. ●, *B. cereus*; ▲, *B. subtilis*; ■, *B. lichniformis.*

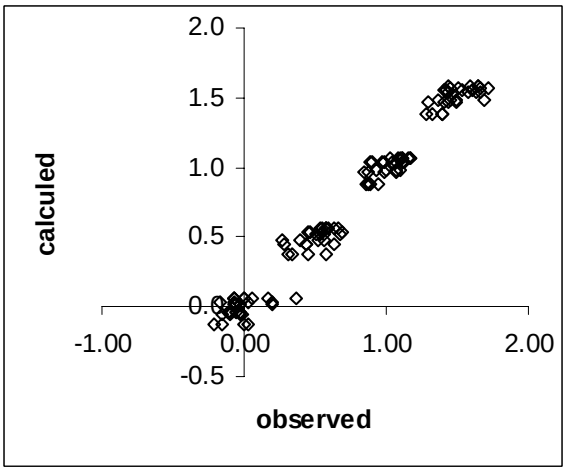


図2310-2　大腸菌の熱死滅のlog Dにおける加熱温度と回復温度の影響の予測値と実測値

エ　考　察

(ア) 大腸菌および枯草菌胞子の熱死滅に対する発育温度、加熱温度、回復温度および各過程における食塩存在の影響の解析とデータ入力および予測モデリング

本研究では、微生物の熱死滅予測について加熱温度など加熱中の条件だけでなくその前後の様々な因子の影響も考慮したモデルを構築し、それらの影響の定量的評価を目指している。本研究で調べた範囲内の条件で加熱温度はもちろんであるが、回復温度も熱死滅に大きく影響することが示された。これは、加熱処理後の損傷菌あるいは損傷胞子の回復能力が温度に依存することによると見られる。食塩の影響については、直接予測モデルのためのデータ取得に入る前に、加熱とその前後の過程における食塩存在の熱死滅への影響を解析した結果、各過程における食塩の影響は異なり、これが全体の熱耐性の挙動を複雑にするものと推察される。

(イ) 枯草菌胞子の熱および *Bacillus* 属細菌胞子の薬剤死滅に対する影響因子の解析とデータ入力

枯草菌胞子の熱死滅についても発育温度と加熱時pHが影響するが、大腸菌と同様にこれらの因子は独立的な効果を示し、複合的な影響は軽微であるとみられる。薬剤については *B. cereus* 胞子が最も過酢酸に耐性で、枯草菌胞子は中間、*B. licheniformis* 胞子が最も感受性であったが、耐性が胞子の種類によって変動する要因は不明である。

オ　今後の課題

(ア) 大腸菌および枯草菌の熱死滅に対する各種因子および各過程における食塩存在の影響の解析とデータ入力

全般に関わる今後の研究の方向性として、より実用的なモデルを構築するためにはその内実化を図って精緻化を進める一方で、とくに食品のミニマムプロセッシングで問題となる熱死滅に至るまでの細胞損傷の実体とその実用面での問題に迫る研究を進展させ、それらの成果を取り入れることが必要である。食塩の影響解析においては、本研究結果をもとに熱処理前後の各過程における食塩の濃度因子も含めて、予測モデリングへの展開を図る必要がある。

(イ) 大腸菌および枯草菌胞子の熱死滅データのグローバルデータベース化と予測モデリング

データベース構築については、他の熱死滅に影響する各種因子についてのデータ収集をさらに展開し、一層のグローバル化に向けて充実させる必要がある。また、各因子間相互の影響をモデル化するとともに、酸化剤などの薬剤殺菌のデータベース化と予測モデリングについてもさらに充実化が期待される。

カ　要　約

(ア) 大腸菌および枯草菌胞子の熱死滅に対する発育温度、加熱温度、回復温度、加熱時pHおよび各過程における食塩存在の影響の解析とデータ入力

食品殺菌への実用化を目指し、大腸菌と枯草菌胞子をモデルに熱死滅への加熱中、加熱前および加熱後の影響因子を含めたデータを収集した。大腸菌では発育温度、加熱温度、回復温度の3因子について検討した結果、D 値は発育温度の低下および加熱温度の上昇に伴って低下し、回復温度については28～31付近で最大になった。 z 値はこれらの因子によってあまり変動せず、4℃付近の値であった。枯草菌胞子の熱死滅は発育温度と加熱温度、加熱時ｐH によって変動した。大腸菌の熱死滅に対する食塩の影響については、発育、加熱前保温、加熱、加熱後保温、回復培養の 5 つの過程における食塩の存在の影響を解析し、それぞれ特有の効果を示すことがわかった。

(イ) 大腸菌および枯草菌胞子の死滅データのグローバルデータベース化と予測モデリング

それぞれの死滅データをもとに、既存の熱死滅実験データベースへの追加入力を行う一方、D 値の対数を検討各因子の関数とし、因子間の相互作用を無視した線型重回帰多項式モデルを用い、熱死滅予測式とした。このモデルの検証において、実測値と予測値とは R^2がほぼ0.90以上となり、比較的よい相関が得られた。その後、大腸菌については、発育温度、加熱温度、回復温度の組み合わせ（4×4×7）実験によって詳細な死滅データを収集した。また、Weibullモデルを併用した線形Bigelowモデルによって発育温度、加熱温度、回復温度の影響の予測式も構築した結果、発育温度の影響は予測以上に少ないことが判明した。また、これらの解析のほか基準関係式を設定し、各因子の変動を補正関数によって定量化する方法も検討した。*Bacillus* 属細菌胞子の過酢酸殺菌における死滅データも取得し、既存の薬剤死滅データベースに追加入力した。

キ　引用文献

Jagannath, A. and Tsuchido. 2003. T.: Predictive microbiology: a review. Biocontrol Sci., 8:1-7.

Mafart P. and Leguérinel I. 1998 Modelling combined effect of temperature and pH on heat resistance of spores by a non-linear Bigelow equation. J. Food Sci., 63:6-8.

Takano, M. and Tsuchido, T. 1982. Availability of growth delay analysis for the evaluation of total injury of stressed bacterial populations: J. Ferment. Technol., 60:189-198.

土戸哲明, Jagannath, A., 中村一郎 2004a. 微生物の熱死滅のデータベースと予測モデリング. 食品と技術, No. 401:1-8.

土戸哲明, 阿部智子, 中村一郎 2004b.加熱殺菌データベースソフトウェア「ThermoKill Database R9100」とその利用. 食品工業, 47(22):37-44.

研究担当者　（土戸哲明*）

第４章　天然毒素等の汚染実態調査及び検出技術の高度化

１　穀類及びその加工品の安全･信頼確保のためのオクラトキシン汚染実態の調査

ア　研究目的

平成15年７月の第26回 Codex 総会において Step８の議題にあるオクラトキシンＡの最大基準値が議論されたが採択には至らなかった。その要因の一つに欧米以外の地域の実態調査データ不足がある。そこでオクラトキシンＡを再現性良く高精度でかつ迅速に分析できる方法を開発し、麦類及びその加工品の汚染実態を解明する必要がある。

イ　研究方法

(ｱ) マイコトキシンに対し抽出効率が高く妨害成分の取り込みが少ないアセトニトリルを主体にした溶媒系を抽出溶媒に使用し、多機能カラムを用いて精製を行う分析法を確立後、国内及び外国産麦類と麦類加工品の汚染実態を解明する。

(ｲ) 蛍光検出器つき HPLC 測定条件に関連を持たした LC－MS の測定条件を検討する。

(ｳ) 多機能カラムのみでは精製が不十分な場合、イムノアフィニティカラムを導入した分析法を検討する。

(ｴ) 検出した試料でオクラトキシン検出キットの有効性を検討する。

(ｵ) コメについて自然汚染米を想定したカビ培養米で分析法を検討する。

(ｶ) 米およびそれらを原料とする加工品を分析して汚染実態を解明する。

ウ　研究結果

(ｱ) 分析法の回収率及び分析精度を確認するため、麦類２、20 μg/kg、コメ 1、5、10 μg/kg 相当量で添加回収試験を実施した。その結果を表2401-1、2401-2に示した。

表2401-1　イムノアフィニティカラム法添加回収試験結果

Sample	spiked level	recovery (%)	RSD (%)	n
Rice	1μg／Kg	86	0.8	5
Rice	5μg／Kg	78	3.8	5
Rice	10μg／Kg	71	6.5	5

表2401-2　米麦類添加回収結果

Sample	spiked level	recovery (%)	RSD (%)	n
Wheat	2μg／Kg	107%	16	5
Wheat	20μg／Kg	106%	1.8	5
barley	20μg／Kg	106%	1.6	5
Rice	20μg／Kg	101%	6.2	5

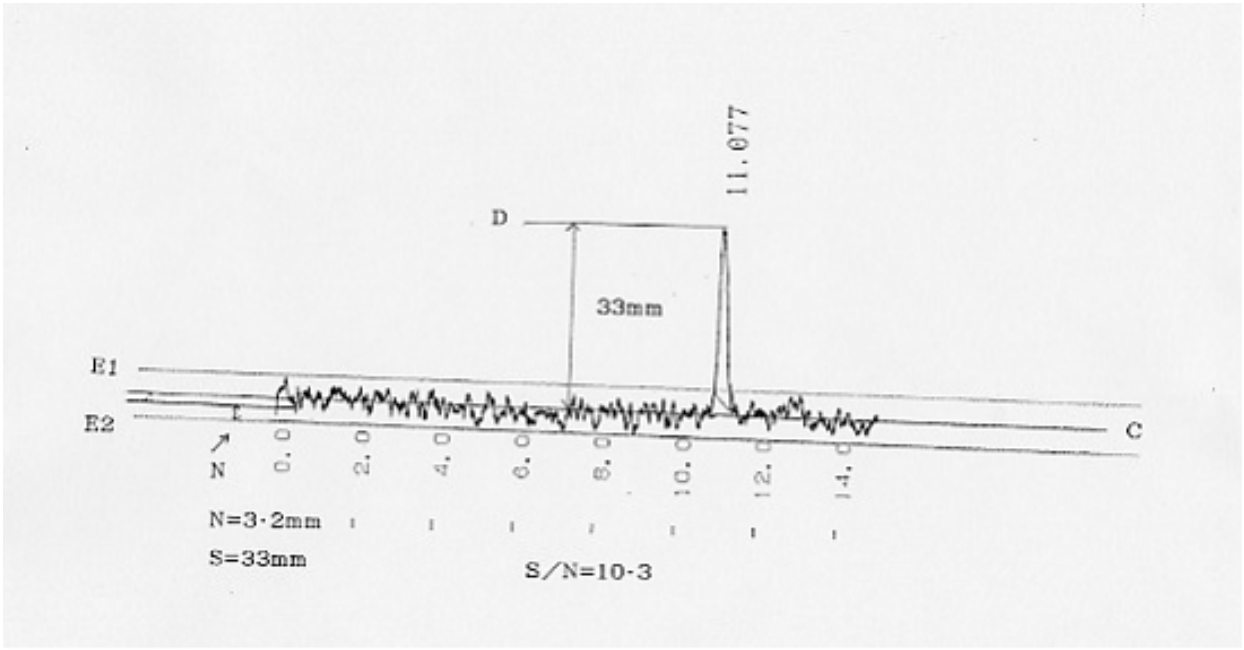


図2401-1　Limit of Quantification

(ｲ) 多機能カラムで 1 μg/kg の定量下限値にする事ができた（図2401-1)。

(ｳ) LC-MS のイオン化は PCI, APPI より ESI が高感度であった。正イオン化モードではプロトン化分子、負イオン化モード脱プロトン化分子がベースピークとして、HPLC(蛍光検出器)とほぼ同感度で検出された（図2401-2)。

(ｴ) 多機能カラムのみでは精製が不十分な場合、イムノアフィニティカラムを導入した分析法にて有効性を確認した。

(ｵ) ELISA との相関は、5 μg/kg 以上のものについては相関を得られたがそれ以下については検出できなかった。

(ｶ) 検出された試料の内訳は、小麦157点中　アメリカ産小麦 1 点、　カナダ産小麦 4 点　大麦46点中オーストラリア産大麦 1 点であり、最大10 μg/kg～最低 2 μg/kg が検出された。

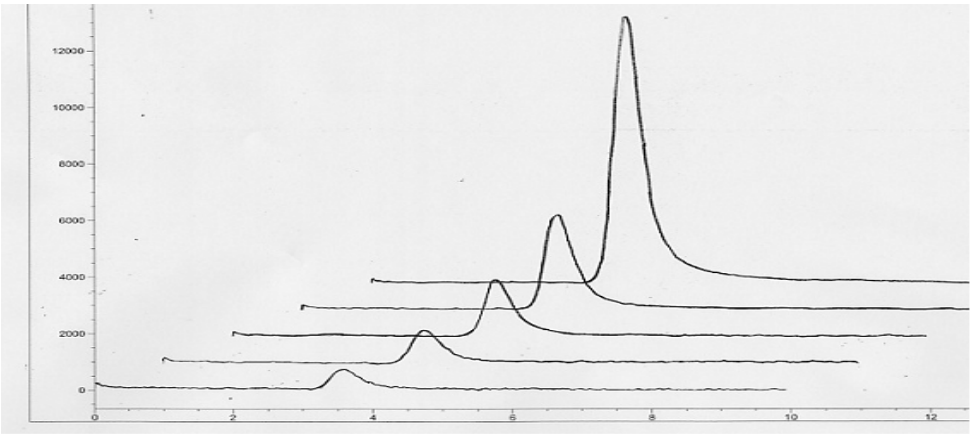


図2401-2　LC-MS　Calibration curve Chromatogram

エ　考　察

(ｱ) 多機能カラムマルチセップ＃229を用いた HPLC 蛍光検出器測定の分析法で定量限界 1 μg/kg をクリアーすることが出来た。抽出操作以降だけなら 4 時間で20点を分析することができる。

(ｲ) LC－MS でのイオン化法は ESI 法ベースピークとしてはネガティブモードにおける脱プロトン化分子402m/z のイオンが高感度に検出できた。

(ｳ) イムノアフィニティーカラムを用いて精製効果を高めた HPLC 蛍光検出器測定法で　の定量限界値は0.1 μg/kg をであった。

(ｴ) ELISA 法では HPLC 法で 5 μg/kg 以上検出されたサンプルとの相関を得ることが　出来た。

(ｵ) 今回の一連の分析法をすべてイムノアフィニティーカラムを用いて行うことも可能だが、カラム 1 本の単価も高額であり、分析時間もマルチセップと比べると時間がかかる、使用期限、保管方法など分析に影響するファクターも多い。多点数のルーチン分析を実施するにはマルチセップ＃229を用い、高感度を必要とするならイムノアフィニティカラムを用いるのが好ましいと考えられる。

オ　今後の課題

(ｱ) 国内産麦類を調査対象とし汚染実態を解明したい。

また、検出された試料群は、さらに調査点数を増やし、汚染実態を解明したい。
できれば、貯蔵されている米麦についても汚染実態を解明したい。

カ　要　約

米麦等穀類及びその加工品は *Aspergillus ochraceus*、*Penicillium viridicatum* 等によりオクラトキシンが産生されることが報告されている。近年、EU，EC での基準値設定、コーデックスでの基準値設定の検討等、国際的に注目されている。そこで、すでに確立したオクラトキシンの分析法を基に、国内外の米麦等穀類及びその加工品の汚染実態を調査解明する事により、安全と信頼を確保する必要がある。

研究担当者（堤　徹、法月廣子*）

2　飼料および血液中オクラトキシン A 分析法の開発と汚染実態調査

ア　研究目的

オクラトキシン A は大麦、小麦などの穀物を汚染するマイコトキシンで、発がん性も指摘されている。オクラトキシン A はこれを摂取した家畜の血液、筋肉、脂肪、卵、腎臓などに残留することが知られている。しかし、食品や飼料のオクラトキシン A 汚染実態の調査は十分でなく、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）第49回会合（2001）で、オクラトキシン A のサーベイランスデータの不足が指摘されている。一方、人や家畜のオクラトキシン A 摂取量を見積もる手段として、血液中のオクラトキシン A の分析が有効であると報告されている。本課題では、飼料および家畜血液中オクラトキシン A の分析法を検討するとともに、これを用いて我が国の飼料および家畜のオクラトキシン A 汚染の実態を調査する。

イ　研究方法

(ｱ) 飼料中オクラトキシン A については、高速液体クロマトグラフィーによる分析のための試料精製法として、市販の抗オクラトキシン A 抗体固相化カラムの応用を検討した。また、オクラトキシン A と構造や毒性が類似しているシトリニンとの同時分析の可能性について、最適な固相抽出法を検討した。さらに、飼料分析における市販 ELISA キットの有用性についても検討した。

(ｲ) 血液については、高速液体クロマトグラフィーカラムスイッチング法を応用した試料の自動前処理による分析法を検討した。

(ｳ) 血液分析用材料は，屠畜場での屠殺時にヘパリン血を採取し、氷冷して実験室に持ち帰った後血漿を分離した。血漿は分析時まで-80℃で保存した。

ウ　研究結果

(ｱ) 飼料中オクラトキシン A 分析法の検討

a　市販抗オクラトキシン A 抗体固相化カラムによる試料前処理法

市販抗オクラトキシン A 抗体固相化カラム（Vicam OchraTest）による試料の前処理法について検討し、配合飼料およびサイレージそれぞれに適した抽出法および抗オクラトキシン A 抗体固相化カラム処理法を確立した。配合飼料は、抽出に80％メタノールを用い、抽出上清を PBS で希釈後ガラス繊維ろ紙で不溶物をろ過し、抗オクラトキシン A 抗体固相化カラム精製に供する方法で効率よく精製できた。サイレージでは、大麦を対象にした AOAC 公定法（Entwisle ら、2000）に準じ、60％アセトニトリルで抽出後上清を PBS で希釈した。サイレージ有機酸で pH が酸性となった場合は、pH を中性付近に調整した。以後は、配合飼料と同様に抗オクラトキシン A 抗体固相化カラムで効率よく精製できた。

b　陰イオン交換カートリッジによる固相抽出法を応用した飼料中オクラトキシン A、シトリニン同時分析法

オクラトキシン A およびシトリニンはいずれも弱酸性化合物であるので、陰イオン交換カートリッジによる同時精製を応用した同時分析法を検討した。配合飼料では、「飼料分析基準」に収載された液液分配法が適用できることを確認した。サイレージについては、酸性下でジクロロメタン抽出後炭酸水素ナトリウムに転溶し、陰イオン交換カートリッジ（Oasis MAX）で精製する方法を確立した。確立した分析条件を表2402-1に示す。

c　市販 ELISA キットの応用

市販のオクラトキシン A 用 ELISA キット（RIDASCREEN FAST）を用いて、配合飼料中オクラトキシン A を分析したところ、マニュアルどおりの操作では、陰性飼料でも陽性の結果が出た。しかし、メタノール抽出液を水で希釈した際に生ずる不溶物を遠心分離で除去することにより、偽陽性反応は消失した。

(ｲ) 血液中オクラトキシン A 分析法の検討

高速液体クロマトグラフィーによる血液オクラトキシン A 分析へのカラムスイッチング法（Langseth ら、1993）の応用を検討したところ、好結果を得た。最適化した分析条件を表2402-2に、典型的クロマトグラムを図2402-1(a)に示す。血液前処理はメタノールによる除蛋白のみで十分であった。定量限界はおよそ0.1 ng/ml であった。標準オクラトキシン A 添加による検量線は、0.1 ng/ml から 5 ng/ml まで直線性を示した。回帰式は、y=37.3 x + 1.50、 R^2=0.997（x: オクラトキシン A 濃度、y: ピーク面積）であった。回収率および反復精度は表2402-3に示したとおりであった。

カラムスイッチング法は、牛乳中オクラトキシン A 分析にも適用できることを確認した（図2402-1(b)）。

表2402-1　飼料中オクラトキシン A、シトリニン同時分析法の概略

抽出・精製

試料に1 N 塩酸を加え振とう
ジクロロメタン抽出（2回）
0.13 M $NaHCO_3$ と分配
$NaHCO_3$層回収
固相抽出カートリッジ(Oasis MAX 6cc/ 150 mg)へ負荷
アセトニトリル：水：HCl（50＋48＋2）　で溶出
溶出液をHPLC分析

HPLC

カラム：　Inertsil ODS-2（250 mm x 4.6 mm）
移動相：　アセトニトリル：水：リン酸＝225：235：1
検　出：　蛍光（EX:340 nm, EM:510 nm）

表2402-2　カラムスイッチング法による血液オクラトキシンの分析条件

分析カラム	：インタクト Unison UK-C18（150 mm x 4.6 mm）
分析用移動相	：アセトニトリル：0.01 M りん酸（1+1）
分析カラム流速	：0.8 ml/min
前処理カラム	：昭和電工 MSpak PK-2A
前処理用移動相	：0.01 M りん酸
前処理カラム流速	：0.8 ml/min
検出	：蛍光（励起波長：330 nm, 蛍光波長:465 nm）
試料注入量	：1 ml（血漿として167μl）

表2402-3　血液オクラトキシン A 分析法の回収率および反復精度

	添加量（ng/ml）	
	1	5
平均回収率（%）	95.1	90.7
相対標準偏差（%）		
日内	3.17	1.80
日間	1.96	1.62
全体	3.73	2.43

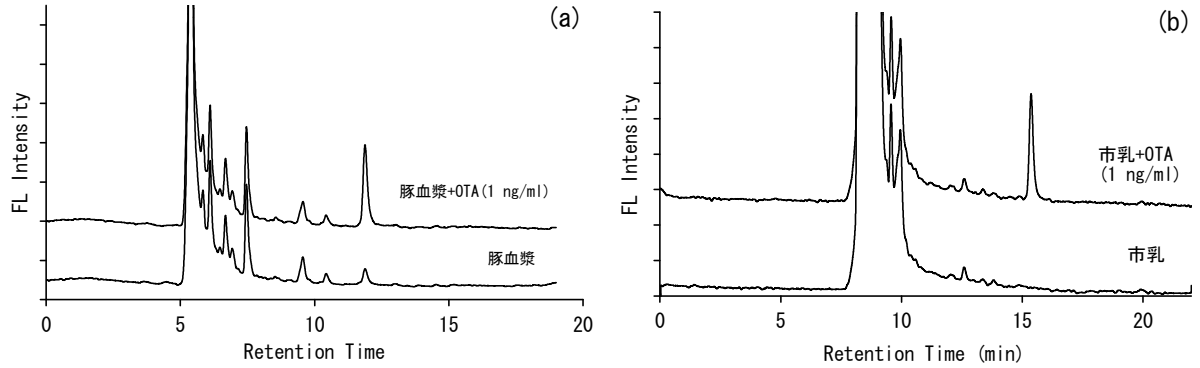


図2402-1　カラムスイッチング高速液体クロマトグラフ法による血漿(a)および牛乳(b)のクロマトグラム

(ｳ) 豚血液中オクラトキシン A 濃度の野外調査

今回確立した方法で、国内4地域、95農場、445頭の豚の血漿オクラトキシン A 濃度を測定した。ほとんどすべての豚の血漿からオクラトキシン A が検出されたが、その濃度はきわめて低かった。また、季節変動（表2402-4）および地域による差（表2402-5）も見られなかった。

豚血漿中オクラトキシン A 濃度は、摂取した飼料

中のオクラトキシン A 濃度とほぼ等しいことが知られているため、今回検出された程度のオクラトキシン A 汚染は、家畜への直接影響および畜産物を介した人への影響ともに無視できるレベルと判断できる（図2402-2）。

表2402-4　地域Cにおける豚血漿オクラトキシン A 濃度の季節変動（2004年）

				OTA（ng/ml）			
採材時期	農家数	動物数	陽性動物数	平均	範　囲		
2月	16	80	75	0.13	0.02	～	0.63
9月	15	74	74	0.19	0.03	～	0.73

表2402-5　各地域における豚血漿オクラトキシン A 濃度の差（2005年、夏）

				OTA（ng/ml）			
地域	農家数	動物数	陽性動物数	平均値	範　囲		
A	17	51	51	0.39	0.05	～	1.25
B	14	59	59	0.31	0.07	～	1.24
C	15	75	75	0.30	0.03	～	1.53
D	11	55	51	0.10	0.02	～	0.78

エ　考　察

飼料中オクラトキシン A の高速液体クロマトグラフィーによる定量のための試料前処理法について検討した。市販の抗オクラトキシン A 抗体固相化カラムを応用した精製法はきわめて精製効率が高く、飼料の分析にも有効であった。飼料をオクラトキシン A と同時汚染する可能性が高く、またオクラトキシン A と同様に腎毒性を有するマイコトキシンにシトリニンがある。この二つのマイコトキシンはいずれも弱酸性物質であるので、陰イオン交換カートリッジを応用した試料精製による、オクラトキシン A、シトリニン同時分析法についても検討した。その結果、市販陰イオン交換カートリッジを応用した試料精製法を最適化し、飼料中オクラトキシン A、シトリニン同時分析法を確立することができた。さらに、市販のオクラトキシン A 分析用 ELISA キットでも、試料調製に若干の変更を加えることにより、配合飼料中オクラトキシン A の簡易分析に応用できることを明らかにした。以上、今回確立した 3 つの分析法を使い分けることにより、効率よく飼料中オクラトキシン A 濃度を分析するシステムを構築できた。

オクラトキシン A は、血液中の蛋白質と結合することおよび腸肝循環をすることから、血液中の半減期が長く、血液中オクラトキシン A 濃度を分析することにより、家畜や人が摂取したオクラトキシン A 量の見積もりが可能であることが知られている（Thuvander ら、2001）。そこで、家畜血液中オクラトキシン A 濃度を簡便・高精度に分析する方法を検討し、カラムスイッチング法を応用して試料前処理を自動化した、ハイスループットな血液中オクラトキシン A 分析法を確立できた。この分析法は、牛乳中オクラトキシン A の分析にも適用可能であった。

わが国で飼養されている豚が摂取している飼料のオクラトキシン A 汚染実態を明らかにするため、今回確立した分析法を応用して、わが国で飼養されている豚の血液中オクラトキシン A 濃度を調査した。北日本から南日本までの4地域で飼養されていた豚の血液を収集し、そのオクラトキシン A 濃度を調査したところ、きわめて微量ではあるが、高頻度にオクラトキシン A が検出された。この結果は Kawamura ら（1990）および Takeda ら（1991）の報告とほぼ一致していた。豚の場合、血液中オクラトキシン A 濃度は、摂取している飼料中オクラトキシン A 濃度とほぼ同レベルであることから（Takeda et al, 1991）、

わが国で流通している豚用配合飼料は高頻度にオクラトキシン A に汚染しているものの、その濃度はきわめて低いことが示唆された。

豚の飼養現場では、飼料タンクでのカビ発生がしばしば指摘されている。配合飼料の製造段階でのオクラトキシンA汚染が無視できるレベルであっても、農家段階で発生したカビによるオクラトキシン A 汚染の可能性は否定できない。そこで、C 地域で飼養されている豚の血液を、カビの発生が少ない冬季とカビが発生しやすい夏季に採取し、その血液中オクラトキシン A 濃度を比較した。その結果、今回調査した限りでは、両者のオクラトキシン A 濃度に差は見られず、農家段階での飼料のオクラトキシン A 汚染の可能性も低いものと思われた。

豚筋肉中のオクラトキシン A 濃度は、血液中濃度の1/10以下であることが知られている（Curtui et al, 2001）。今回得られたデータと、EU から提示されている人のオクラトキシン A に対する TDI 値から、わが国で生産されている豚肉由来のオクラトキシン A の TDI に対する寄与率を見積もった（図2402-2）。

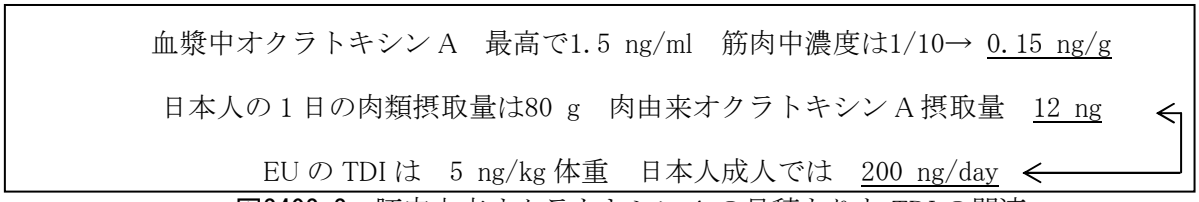


図2402-2　豚肉由来オクラトキシン A の見積もりと TDI の関連

図2402-2に示したように、わが国の豚すべてが、今回検出された最高レベルのオクラトキシン A に汚染しており、摂取する肉がすべて豚肉と仮定しても、JECFA のそれよりも厳しい EU の TDI に対する寄与率は低いことが明らかになった。

オ　今後の課題

今回の検討で、豚血液中オクラトキシン A の調査を実施したところ、微量ではあるが高頻度にオクラトキシン A が検出された。考察で述べたように、今回検出されたレベルのオクラトキシン A の TDI に対する寄与率は低く、ただちに人の健康に影響を及ぼすものではないと考えられるが、今後も継続的なモニタリングは必要である。

カ　要　約

陰イオン交換カートリッジを応用した固相抽出法と高速液体クロマトグラフィーによる分析を組み合わせた、サイレージを含む家畜飼料中オクラトキシン A、シトリニン同時分析法を確立した。また、カラムスイッチング法を応用した高速液体クロマトグラフィーによる、家畜血液中オクラトキシン A 分析法を確立し、これが、牛乳の分析にも適用可能であることを明らかにした。さらに、今回確立した、血液中オクラトキシン A 分析法を応用し、わが国で使用されている豚の血液中オクラトキシン濃度の野外調査を実施した。その結果、豚血液から高頻度にオクラトキシン A が検出されたが、その濃度はきわめて低く、人の健康に影響を及ぼすレベルではないことが明らかになった。

キ　引用文献

Curtui. V. G. et al. 2001 A simple HPLC method for the determination of the mycotoxins ochratoxin A and B in blood serum of swine. Food Addit. Contam 18:635-643.

Entwisle, A. C. et al. 2000 Liquid Chromatographic method with immunoaffinity column cleanup for determination of ochratoxin A in barley. J. AOAC. 83:1377-1383.

Kawamura, O. et al. 1990 Enzyme-linked immunoassay for determination and survey of ochratoxin A in livestock sera and mixed feeds. Food Agric. Immunol. 2:135-143.

Langseth, W. et al. 1993 Ochratoxin A in plasma of Norweigian swine determined by an HPLC column-switching method. Nat. Toxin. 1:216-221.

Takeda, N. et al. 1991 Solid-phase extraction and cleaup for liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in pig serum. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 47:198-203.

Thuvander, A et al. 2001 Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. Food Chem. Toxicol. 39:1145-1151.

研究担当者（宮崎茂*、山中典子）

3　リンゴにおけるパツリン生産菌の発生実態調査および防除技術の開発

ア　研究目的

パツリンは *Penicillium* や *Aspergillus* 属菌によって産生されるマイコトキシンである。パツリンは経口の急性毒性が高いことが動物実験によって知られており、パツリンに汚染されたリンゴ加工食品を摂取した際の健康被害の発生が懸念されている（宇田川ら、1978；宇田川、2004）。国内ではパツリン産生菌である *P. expansum*（リンゴ青かび病菌）による青かび病の記載はあるが、本病菌による被害実態やパツリン産生の有無については調べられていない。本研究では、*Penicillium* 属菌によるリンゴ果実のパツリン汚染を明らかにする目的で、リンゴ園およびジュース工場から果実を採集し、リンゴに腐敗を引き起こす *Penicillium* 属菌の分離頻度を調査した。さらに、リンゴ果実に感染しパツリンを産生する *Penicillium* 属菌を特定し、リンゴ果実に対する本病菌の侵入部位を明らかにした。

リンゴ果実における青かび病の発生抑制には貯蔵庫のガス成分を制御する CA（Controled Atmosphere）貯蔵が有効であるが、加工用リンゴに対しては、より低コストの防方法が求められている（農業・生物系特定産業技術研究機構、2006）。そこで、野菜で実用化されている MA（Modified Atmosphere）保存用のバッグを用いてリンゴ果実に対する青かび病発生を抑制可能な保存技術の開発を行う。ここでは MA バッグ内で青かび病菌を接種したリンゴ果実を貯蔵し、腐敗の発生およびパツリン蓄積量について調べた。

イ　研究方法

(ｱ) リンゴ園で採集した腐敗果、傷害果および園地土壌からの *Penicillium* 属菌の分離

果樹研究所リンゴ研究部内の圃場からリンゴ傷害果を採集し、一定期間放置して腐敗が生じた果実から *Penicillium* 属菌の分離を試みた。分離は、腐敗果実上に生じた *Penicillium* 属菌のものと思われる緑色の分生胞子を柄付き針で採集し、コーンミール寒天培地またはローズベンガル添加 Potato Dextrose Agar 培地上に画線することで行った。

アスファルト上でリンゴ果実を転がして打撲様に付傷させたリンゴ果実（品種‘ふじ’）に同研究部内圃場で採集した土壌をまぶした。このような処理をした果実を一定期間室温に放置して生じた腐敗果から *Penicillium* 属菌の分離を試みた。

上記の両試験において分離された *Penicillium* 属菌と思われる菌株は、新鮮なリンゴ果実（品種‘祝’）に分生胞子を穿刺接種し腐敗の発生を調べるとともに、東北農業研究センターおよび東京都健康安全研究センターにおいて生じた腐敗部分におけるパツリン分析を行った。

(ｲ) リンゴジュース工場に集積された原料果実からの *Penicillium* 属菌の分離

2003年11月および12月、2004年 3 月に国内の複数のリンゴジュース工場を訪問し、原料果実から *Penicillium* 属菌の分離を試みた。2003年訪問時には、搾汁ラインに入る前に果実から除去された傷害片、腐敗片を採集し、*Penicillium* 属菌の分離を試みた。2004年訪問時には、倉庫内で貯蔵中の果実から腐敗果を採集し *Penicillium* 属菌の分離を試みた。分離された *Penicillium* 属菌は新鮮なリンゴ果実（品種‘王林’）に接種し病原性を確認するとともに、前述の研究機関にパツリン分析を依頼した。

(ｳ) リンゴ果実に腐敗を引き起こしパツリンを産生するペニシリウム属菌の特定

2003～2004年にかけてリンゴジュース工場から採集した腐敗果実片から分離された *Penicillium* 属菌のうち、接種によってリンゴ果実に腐敗を引き起こし、さらにパツリン産生能を有する菌株から DNA を抽出し、PCR 法によってリボゾーム RNA 遺伝子上の ITS（Internal Transcribed Spacer）領域を増幅した。増幅産物を 4 種の制限酵素（BanIII、HaeIII、HinfI および MspI）で消化して得られたバンドパターンを、すでに同定済みの *P. expansum* 菌株（東京都健康安全研究センター保存株）と比較した。

(ｴ) リンゴ果実における青かび病菌の侵入部位

リンゴ果実にフォーク（果皮を突き破る傷）またはカーボランダム（果皮を突き破らない微細な傷）で付傷し、青かび病菌分生胞子を2.1×10^8 cells/ml の濃度で噴霧接種し、付傷の種類による発病率の差違を比較した。また、人為的に付傷していない‘ふじ’、‘ゴールデン・デリシャス’果実にも青かび病菌分生胞子を3.0×10^8 cells/ml の濃度で噴霧接種し、本病菌の侵入部位を調べた。

(ｵ) MA バッグに貯蔵した青かび病菌接種リンゴ果実におけるパツリン蓄積量

酸素透過性の異なる 3 種類の MA 保存用プラス

チックバッグ（商品名：P-プラス R）は（株）住友ベークライトから提供を受けた。なお、各バッグの酸素透過率は非公表であった。試験区は、MA バッグ-1、MA バッグ-2、MA バッグ-3、ハイブリバッグ（酸素無透過）、プラカップ（対照区）、無接種の 6 試験区を設けた。果樹研究所リンゴ研究部で収穫されたリンゴ果実（品種‘ふじ’）に当研究室で分離した *P. expansum* Pa553株の分生胞子を穿刺接種した直後、各容器に収納した。各試験区につき果実を 5 個供試した。MA バッグおよびハイブリバッグは外気を遮断するためにシーラーで密封した。各容器に収納した果実は 5 ℃で 1 ヶ月間貯蔵した。貯蔵終了後、容器から果実を取り出し、直ちに生じた腐敗の直径および果重を測定したのち搾汁した。果汁からのパツリン分析は東北農業研究センターで行った。

ウ　研究結果

(ｱ) リンゴ園で採集した腐敗果、傷害果および園地土壌からの *Penicillium* 属菌の分離

果樹研究所リンゴ研究部圃場内の調査では、傷害果、腐敗果470果実のうち29果実で *Penicillium* 属菌様のコロニーが生じ 1 菌株の *Penicillium* 属菌を分離した（表2403-1）。この菌株を新鮮なリンゴ果実に接種すると腐敗を生じ、さらに腐敗部分からパツリンが検出された（表2403-2）。付傷処理を行ったのち園地土壌をまぶした果実を用いた試験では、28果実で *Penicillium* 属菌様のコロニーが生じ、13 菌株の *Penicillium* 属菌を分離した。分離された13菌株のうち11菌株がパツリン生産能を有していた。また付傷処理のみの試験区も設けたが、このような試験区でも 5 果実で *Penicillium* 属菌様のコロニーが生じ 3 菌株の *Penicillium* 属菌を分離した。分離された 3 菌株のうち 1 菌株がパツリン生産能を有していた。一方、付傷処理を行わなかった果実では土壌をまぶしても腐敗を生じなかったことから、*Penicillium* 属菌の感染には傷口が必要と考えられた。

(ｲ) リンゴジュース工場に集積された原料果実からの *Penicillium* 属菌の分離

2003年11月採集果実では、合わせて401果実片から菌の分離を行い17果実片から *Penicillium* 属菌を分離した。分離された17菌株のうち13菌株は接種により新鮮なリンゴ果実に腐敗を引き起こした。12月採集果実片では、合わせて307果実片から菌の分離を行い、27果実片から *Penicillium* 属菌を分離した。分離された27菌株はすべてが新鮮なリンゴ果実に腐敗を引き起こした。2004年 3 月採集果実では合わせて383果実から菌の分離を行い、107果実から *Penicillium* 属菌を分離した。分離された107菌株のうち105菌株が新鮮なリンゴ果実に腐敗を引き起こした（表2403-3）。

(ｳ) リンゴ果実に腐敗を引き起こしパツリンを産生する *Penicillium* 属菌の特定

ジュース工場から採集された *Penicillium* 属菌のうち、リンゴ果実に腐敗を引き起こし、さらにパツリン生産能を有する菌株の DNA から増幅されたリボゾーム RNA 遺伝子 ITS 領域の各種制限酵素処理によるバンドパターンは、既に同定済みの *P. expansum* 菌株と同一であり、リンゴジュース工場から分離されたパツリン生産能を有する *Penicillium* 属菌はすべて *P. expansum* と考えられた。

(ｴ) リンゴ果実における青かび病菌の侵入部位

‘ふじ’果実を25個供試し、フォーク付傷区とカーボランダム付傷区で、青かび病菌接種果実における果実腐敗の発生率を比較した。フォーク付傷区では接種 1 週間後に供試した全果実で腐敗が起こったのに対し、カーボランダム付傷区では接種 2 週間後に 1 果実のみで腐敗の発生がみられた（表2403-4）。無傷区でも腐敗の発生がみられたが、これは果点または果実病面の荒れ（さび）を中心に腐敗が拡大しており、病原菌が果点やさびから侵入して腐敗が発生したと考えられた。人為的に付傷していない果実を用いて青かび病菌の侵入部位を調べた結果、青かび病の発生部位は、つる割れ、果面さび、果点、がくあ部であった（表2403-5）。

(ｵ) MA バッグに貯蔵した青かび病菌接種リンゴ果実におけるパツリン蓄積量

設定したすべての接種区において青かび病菌による腐敗が生じた。外気が自由に出入りするプラカップ区では腐敗部上に分生胞子が旺盛に形成された一方で、バッグに収納した試験区はいずれも腐敗部に分生胞子を形成しなかった（写真2403-1）。MA バッグ区では、いずれの試験区においてもプラカップ区に比較してパツリンの産生が抑制され、とくに MA バッグ-1および MA バッグ-2ではパツリンの規制値（50 ppb）を下回った（表2403-6）。ハイブリバッグ区では、腐敗の進展およびパツリン蓄積が強く抑制されたものの、果皮の赤色が退色したり異臭が発生するなどの障害が発生した。

表2403-1　果樹研リンゴ研究部内圃場で採集した果実からの *Penicillium* 属菌の分離頻度

傷害の種類	分離頻度[a]	病原菌の割合[b]	パツリン生産菌の割合[c]
つる割れ	0/65	—	—
樹上傷害果	0/43	—	—
落果（裂果）	1/77	1/1（1.3%）	1/1
落果（無傷）	0/285	—	—

[a] *Penicillium*属菌分離数／調査果数

[b] 果実腐敗を引き起こした菌株数／分離された*Penicillium*属菌菌株数

[c] パツリン産生菌数／果実腐敗を引き起こした菌株数

樹上傷害は、枝幹と果実が擦れた擦過傷、鳥による食害

表2403-2　付傷果に土壌を接触させた場合の *Penicillium* 属菌の分離頻度

処　理	分離頻度[b]	病原菌の割合[c]	パツリン生産菌の割合[d]
無処理	0/219	−	−
付傷のみ[a]	3/146	1/3（0.7%）	1/1
付傷＋土壌付着	13/163	11/13（6.7%）	11/11

[a] リンゴ果実をアスファルトの上で転がし傷を付けた

[b] *Penicillium*属菌分離果数／調査果数

[c] 果実腐敗を引き起こした菌株数／分離された*Penicillium*属菌菌株数

[d] パツリン産生菌数／果実腐敗を引き起こした菌株数

表2403-3　リンゴジュース工場で採集した果実片または貯蔵果からの *Penicillium* 属菌の分離頻度

	A工場	B工場	C工場
2003.11調査			
*Penicillium*属菌分離頻度	8/143	5/128	4/130
病原菌の割合[a]	6/8（4.2%）	4/5（3.1%）	3/4（2.3%）
2003.12調査			
*Penicillium*属菌分離頻度	調査せず	27/197	0/110
病原菌の割合		27/27（13.7%）	—
2004.3調査			
*Penicillium*属菌分離頻度	36/168	71/215	調査せず
病原菌の割合	35/36（20.8%）	70/71（32.6%）	

[a] 果実腐敗を引き起こした菌株数／分離された*Penicillium*属菌菌株数

表2403-4　人為的な付傷の種類と果実腐敗発生程度の差違

接種後日数	傷の種類		
	カーボランダム	フォーク	無傷
7	0/25[a]	25/25	2/25
14	1/25	25/25	3/25

[a] 発病果数／供試果数

表2403-5　リンゴ果実における青かび病菌侵入部位

接種後日数	ふじ発病果数			ゴールデン・デリシャス発病果数		
	接種区	無接種区	発病部位（果実数）	接種区	無接種区	発病部位（果実数）
7	4/12[a]	0/4	つる割れ(2) 果点(1) 果面さび(1)	7/15	0/5	つる割れ(7) 果点(3)
14	5/12	0/4	つる割れ(2) 果点(1) 果面さび(1) がくあ部(3)	10/15	0/5	つる割れ(7) 果点(8) がくあ部(1)

[a] 発病果数／供試果数

表2403-6　各貯蔵条件下におけるパツリン蓄積量

試験区	病斑直径（cm）	果重(g)	ジュース量（ml）	果実あたりパツリン量(ppb)
MAバッグ-1	3.1±0.0	200.4±7.8	140.3±5.4	1.9±0.5
MAバッグ-2	3.6±0.1	206.9±5.8	144.8±4.1	19.6±7.1
MAバッグ-3	3.8±0.1	199.4±5.4	139.6±3.8	47.5±13.8
ハイブリバッグ	1.1±0.1	175.5±6.3	122.8±4.4	検出限界以下
プラカップ	4.7±0.1	211.1±18.2	147.8±12.8	423.2±127.9
無接種	—	206.7±5.7	144.7±4.0	検出限界以下

検出限界：4 μg/L(4ppb)
定量限界：10 μg/L(10ppb)

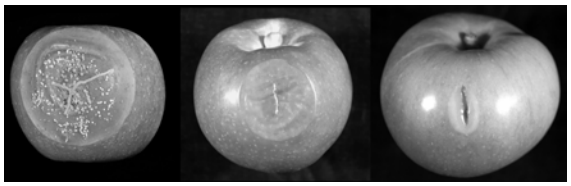


写真2403-1　各貯蔵条件下での青かび病の進展
（左：プラカップ、中央：MA バッグ-1、右：ハイブリバッグ）

エ　考　察

(ア) リンゴ園で採集した腐敗果、傷害果および園地土壌からの *Penicillium* 属菌の分離

この調査では、リンゴ園で採集された腐敗果、傷害果さらに園地土壌から実際にパツリン生産能を有する *Penicillium* 属菌が分離されるかどうかを調べた。園地での果実収集調査では *Penicillium* 属菌の分離頻度は必ずしも高くなかったが、園地に放置された腐敗果あるいは傷害果にパツリン生産能を有する *Penicillium* 属菌が感染していることが明らかになった。また、付傷処理を行ったリンゴ果実を用いて園地土壌からの *Penicillium* 属菌の捕捉を試みた結果、同様にパツリン生産能を有する *Penicillium* 属菌が分離され、園地土壌中にパツリン生産菌が生息すること

が明らかになった。園地で採集した腐敗果、傷害果からの *Penicillium* 属菌の分離試験あるいは付傷処理を行ったリンゴ果実を用いた土壌からの分離試験で、いずれも果実表面に傷があり、さらに土壌が接触した条件で *Penicillium* 属菌による腐敗が生じていたことが共通していた。ジュース原料となるリンゴ果実としては外観的な傷害が原因で生食用の販売に適さないものが用いられることから、このような傷害を通じて土壌からパツリン産生菌が感染することは十分に予想される。

(ｲ) リンゴジュース工場に集積された原料果実からの *Penicillium* 属菌の分離

リンゴジュース工場から採集された果実片あるいは腐敗果から *Penicillium* 属菌が分離され、この中にはパツリン産生能を有する菌株が含まれていた。2003年秋の調査に比較し2004年春の調査ではパツリン産生菌の分離率が上昇していた。この理由として①秋に収穫した果実がすでにパツリン生産菌の感染を受けており貯蔵期間中に腐敗が進行し菌が検出可能なレベルに達していた、②パツリン生産菌が貯蔵中に分生胞子を形成し二次的に被害が拡大した、の二つが考えられる。原料果実からパツリン生産菌が分離されたことから、国内のリンゴジュースもパツリン汚染の危険に常にさらされていると考えられた。

(ｳ) リンゴ果実に腐敗を引き起こしパツリンを産生する *Penicillium* 属菌の特定

パツリン生産菌としては、*Penicillium* 属だけでも複数種が報告されている（宇田川ら、1978；宇田川、2004)。このうち、*P. expansum* はリンゴ青かび病菌として国内外で記載されている。*Penicillium* 属菌は形態的に類似したものが多いことから、リンゴから分離されたパツリン生産菌を特定するために、菌のリボゾーム RNA 遺伝子 ITS 領域の解析を行った。この領域は現在多くの糸状菌で塩基配列の解析が進んでおり、系統関係を解析するための指標の一つとして用いられている(White, 1990; Takamatsu, 1998)。既に同定済みの *P. expansum* を基準株としてリンゴから分離されたパツリン生産菌と比較すると、用いたリンゴ分離株はすべて基準株と一致したことからリンゴ分離株は *P. expansum* と考えられた。

(ｴ) リンゴ果実における青かび病菌の侵入部位

上記(ｱ)において果実表面の傷がパツリン生産菌の侵入門戸となることが示唆されたことから、傷の種類と発病との関係について調査を行った。果皮を突き破る傷では高率にパツリン産生菌による腐敗が発生したことから、本菌は果皮を突き破って果肉が露出するような傷から侵入しやすいことが示唆された。一方、人為的な付傷のない果実に接種した場合、つる割れなどの自然発生した傷口から本菌が侵入することが明らかとなった。つる割れは生理的に起こる果皮の裂開であり果肉が露出すること、また果点は気孔の名残であり内部の果肉とつながっていることから菌の侵入門戸になりやすいと考えられた。今回の接種では高濃度の分生胞子懸濁液を用いたことから、野外で果点、果面さび、がくあ部から菌が侵入する危険性は低いと思われるが、貯蔵中に青かび病を発病し分生胞子を旺盛に作っている果実と健全果が隣り合った場合には、これらの自然開口部から菌が侵入する危険性が高いと予想される。

(ｵ) MA バッグに貯蔵した青かび病菌接種リンゴ果実におけるパツリン蓄積量

CA 貯蔵と同様に MA バッグ内でも分生胞子の形成も抑制されることから（Rosenberger, 1990)、青かび病菌の感染を受けた果実が混入しても隣り合った果実への病気の拡散が抑えられると思われた。プラスチックバッグをリンゴ果実の鮮度保持に利用するための研究は神戸ら（1975）によって行われており、プラスチックバッグに果実を収納して冷蔵保存することで鮮度保持が可能であることが示されている。彼らの研究においても、厚い材質のバッグでは果肉の褐変など障害が起こることが報告されている。本研究でもハイブリバッグのような酸素を透過しない厚い材質のバッグでは異臭の発生など障害が発生することが認められている。MA バッグではパツリン産生抑制が認められ、貯蔵中の障害発生もみられなかったことから、貯蔵果実におけるパツリン蓄積抑制に有効と考えられた。

オ　今後の課題

(ｱ) リンゴ園で採集した腐敗果、傷害果および園地土壌からの *Penicillium* 属菌の分離

パツリン産生能を有する *Penicillium* 属菌は国内のリンゴ園地に広く分布しているのではないかと予想されるが、今後、多くの園地土壌からの菌の分離を行うことによってその分布を明らかにする。

(ｳ) リンゴ果実に腐敗を引き起こしパツリンを産生する *Penicillium* 属菌の特定

リンゴ青かび病菌として記載されているのは *P. expansum* のみであるが、他の *Penicillium* 属菌でもパツリン生産能を有することが明らかにされている。また、パツリン産生能を有する糸状菌は *Penicillium* 属菌以外にも報告されていることから、これらのパツリン生産菌がリンゴ果実に病原性を有するかどうか再確認する。

(オ) MA バッグに貯蔵した青かび病菌接種リンゴ果実におけるパツリン蓄積量

ジュース製造に用いられる主要なリンゴ品種を対象として MA バッグによるパツリン蓄積抑制効果を確認する必要がある。また、より大規模な貯蔵試験でもパツリン抑制効果が認められるか、確認する必要がある。

カ　要　約

(ア) リンゴ園で採集した腐敗果、傷害果および園地土壌からの *Penicillium* 属菌の分離

果樹研究所リンゴ研究内で採集したリンゴ腐敗果、傷害果からパツリン産生能を有する *Penicillium* 属菌が分離された。また、人為的に付傷処理を行ったリンゴ果実を用いて、同研究部内圃場で採集した土壌からもパツリン産生能を有する *Penicillium* 属菌が捕捉された。

(イ) リンゴジュース工場に集積された原料果実からの *Penicillium* 属菌の分離

国内数カ所のリンゴジュース工場を訪問し、搾汁ラインに入る前に除去された腐敗果片、傷害果片あるいは貯蔵中に生じた腐敗果を採集した。これらからパツリン産生能を有する *Penicillium* 属菌が分離された。

(ウ) リンゴ果実に腐敗を引き起こしパツリンを産生する *Penicillium* 属菌の特定

既に *P. expansum* と同定された菌株を基準株として、リボゾーム RNA 遺伝子 ITS 領域の解析に基づいて、リンゴから分離された *Penicillium* 属菌の特定を行った。その結果、パツリン産生能を有しリンゴ果実に腐敗を引き起こす菌株はすべて *P. expansum* と特定された。

(エ) リンゴ果実における青かび病菌の侵入部位

リンゴ果実表面に生じた傷の種類と腐敗発生との関係を調べた結果、果実表面に人為的に付傷した場合は、果皮を突き破り果肉が露出するような大きな傷口から青かび病菌が高率で感染した。自然発生した傷口では、つる割れ、果面さび、果点、がくあ部から青かび病菌が感染可能であることが明らかになった。

(オ) MA バッグに貯蔵した青かび病菌接種リンゴ果実におけるパツリン蓄積量

青かび病の発生抑制には CA 貯蔵が有効であることから、CA 貯蔵の条件を模した MA 保存に青かび病発生抑制効果があるかどうかを調べた。MA 保存用プラスチックバッグに、*P. expansum* を接種した果実を収納し一定期間放置後の腐敗の進展およびパツリン蓄積量を調べた結果、パツリンの蓄積が規制値以下に抑制された。また同時に青かび病の伝染源となる分生胞子の形成も抑制された。

キ　引用文献

1) 神戸和盛登ら　1975.　リンゴの貯蔵に関する研究　第 1 報．リンゴ果実のポリエチレン包装による鮮度保持．秋田県果樹試験場研究報告．7:1-34

2) 農業・生物系特定産業技術研究機構　2006.　CA 貯蔵（最新農業事典）．農文協．　606-607.

3) Rosenberger D. A. 1990. Blue Mold. In: Compendium of Apple and Pear Diseases. APS Press. 54-55.

4) Takamatsu S. 1998. PCR Applications in Fungal Phylogeny. In: Applications of PCR in Mycology. CAB International. 125-152.

5) 宇田川俊一ら　1978.　菌類図鑑．講談社．164-165.

6) 宇田川俊一　2004.　食品のカビ汚染と危害．幸書房．87-88.

7) White T. J. et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a Guide to Methods and Applications. Academic Press. 315-322.

研究担当者（須崎浩一*・伊藤　伝・兼松聡子）

4　パツリン産生菌のマイコトキシン産生能に及ぼすリンゴ品種の影響と汚染実態調査

ア　研究目的

パツリンはリンゴ腐敗菌の生産するかび毒であり、動物実験で有害性が報告されている。東北地域は全国のリンゴ生産量に占める割合が高いことから、早急にパツリンの分析体制を確立するとともに、リンゴ及びその加工品のパツリン有無・含有量等を調査する必要がある。また、パツリンの生産菌である *Penicillium expansum* は、複数のかび毒を産生することが報告されている（Anderson et al.，2004）。中でもシトリニンは、腐敗果での産生が確認されており（Martins et al.，2002）、複合汚染の可能性があることからパツリンとともに分析技術の確立が必要である。

本課題では、パツリン分析体制を確立し東北地域で生産されたリンゴジュースの含有量を調査するとともに製造現場の加工過程における変動を調査する。シトリニンについても分析法を確立し、果実にパツリン産生菌を接種しシトリニン産生が確認された場合には、産生菌のパツリン及びシトリニン産生能に及ぼすリンゴ品種の影響、市販品の汚染実態を調査する。

イ　研究方法

(ｱ) パツリン分析法の確立と汚染実態調査

a　パツリン分析法の検討

パツリンの分析法については、HPLC 法である AOAC 2000.02法（MacDonald et al.，2000）の適用を検討するとともに、存在が推定された場合には、LC-MS 法での確認を検討した。

b　市販リンゴジュースのパツリン分析

リンゴジュースは東北地域内の各県小売店で収集した。平成15年度：青森（県産）59点、岩手59点、秋田15点、山形 6 点、長野 1 点、国産表示 3 点であり、輸入品及び外国産果汁を原料とするもの（無表示含む）36点、リンゴ果汁原料使用ジュース（無表示） 9 点（計188点）。平成16年度：青森80点、岩手28点、秋田20点、宮城 1 点、山形 1 点、福島24点、長野 2 点、輸入品及び外国産を原料とするもの（無表示含む）10点（計166点）。

c　リンゴジュース工場で収集したサンプルのパツリン分析

リンゴジュース工場で 3 つの時期（2003年10月、2003年12月、2004年 4 月）に果実、搾り滓及び果汁をサンプリングした。

d　パツリン産生菌の果実接種後の含量の推移

パツリン産生菌（*Penicillium expansum*）を接種したリンゴを20℃で貯蔵し、病斑の大きさ及びパツリン含有量を 3 日毎に21日目まで測定した。

(ｲ) シトリニン分析法の確立と汚染実態調査及びリンゴ品種のかび毒産生に及ぼす影響の調査

a　シトリニン分析法の検討

蛍光検出器を接続した HPLC で分離、検出限界、定量限界等の分析条件を検討した。リンゴジュースにシトリニン標準標品を添加し、複数溶媒で添加回収試験を実施した。

b　2005年に収集したリンゴジュース製品のパツリン及びシトリニン分析

パツリン産生菌を接種したリンゴから調製した果汁についてシトリニン分析を実施したところシトリニンが検出されたことから、パツリンとともにシトリニンについて収集したリンゴジュースのパツリン及びシトリニン分析を実施した。2005年に青森県及び岩手県で収集した各50点の国産果実を原料としたリンゴジュース100点について、パツリン及びシトリニン分析を実施した。

c　リンゴ品種のマイコトキシン産生能に及ぼす影響の調査

リンゴ主要 5 品種（つがる、さんさ、ジョナゴールド、ふじ、王林）にパツリン産生菌（*Penicillium expansum*）（ATCC36200）を接種し、25℃で貯蔵。経時的に病斑の大きさを計測し、接種後12、16日目の果実から調製した果汁のパツリン及びシトリニン含量を測定した。

ウ　研究結果

(ｱ) パツリン分析法の確立と汚染実態調査

a　パツリン分析法の検討

パツリンの分析法としては HPLC 法が最も一般的であり、また確認も LC-MS 法を適用しやすいことから AOAC2000.02法（ODS カラム、UV276 nm 検出）を採用した。本法でパツリンのピークは分離の確認の必要な5-HMF（ヒドロキシメツルフルフラール）と良好な分離を示した（図2404-1）。本分析法では10 μg/L をパツリンの定量限界（S/N 比10以上）、4 μg/L を検出限界（S/N 比 3 ）とした。パツリンの存在が推定されたサンプルは、LC-MS（APCI、ポジティブイ

オンモード）により確認が可能であった（図2404-2）。本法でリンゴジュースのパツリン分析に関するプロフィシエンシーテスト（FAPAS）に参加し、分析値の信頼性保証を継続して受けている。

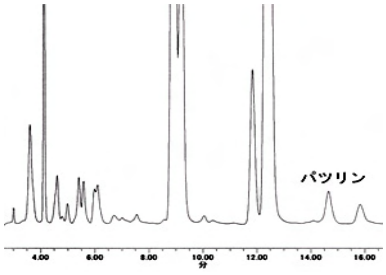


図2404-1　パツリン添加リンゴジュースのHPLCクロマトグラム

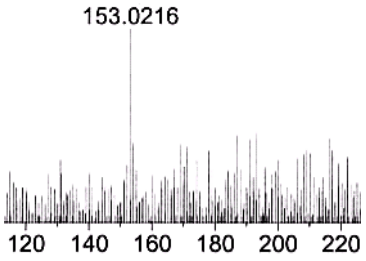


図2404-2　LC-MSによるパツリンの確認

b　市販リンゴジュースの分析

リンゴジュースのパツリン含量は、15年度：国産果実原料製品、ND（検出されず）が140点であったが、3点から検出された（10、7、6 μg/L）（図2404-3A）。輸入品及び外国産果汁使用製品では ND が39点であったが、6点にパツリンが検出された（図2404-3B）。16年度：国産果実原料製品はND155点であったが、1点から検出された（21 μg/L）（図2404-3C）。輸入品及び外国産果汁使用製品では10点全て ND であった。2年間の調査の結果、コーデックスで設定された基準値（50 ng/g=50 μg/L）を超える製品は認められなかった。

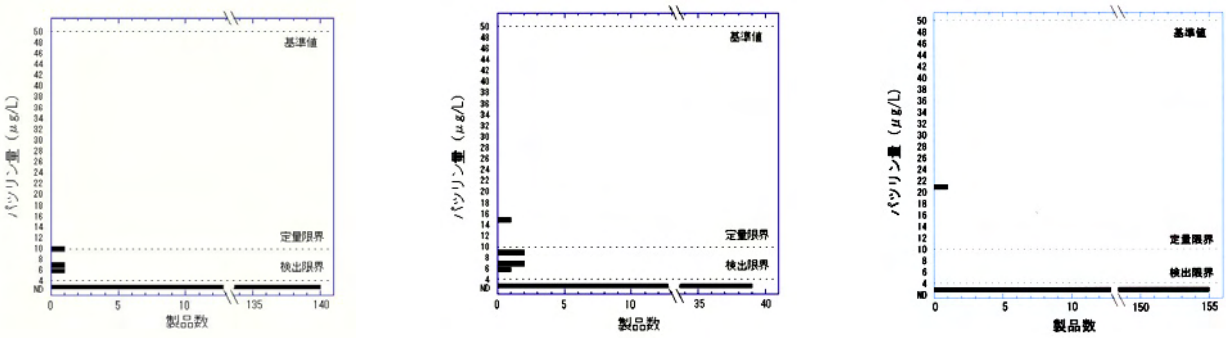


図2404-3　収集リンゴジュースのパツリン含量

A：平成15年度国産果実使用製品

B：平成15年度輸入製品及び輸入果汁使用製品

C：平成16年度国産果実使用製品

c　リンゴジュース工場で収集したサンプルのパツリン分析

3つのサンプリング時期のうち、2003年10月にサンプリングした搾り滓28点から9 μg/L と12 μg/L、果実38点から23 μg/L のパツリンが検出された（果汁18点については全て ND）が、コーデックスの基準値を超えるものは認められなかった。

d　パツリン産生菌の果実接種後の含量の推移

パツリンは接種後6日目の病斑が直径1.5cm 程度の大きさで検出された。以降、病斑が大きくなるにつれてパツリン量は増加し、特に12日目以降の増加が著しかった（表2404-1）。

表2404-1　パツリン産生菌接種リンゴのパツリン含量の推移

播種後日数	0	3	6	9	12	15	18	21
パツリン(μg/L)	ND	ND	16	31	408	1452	9891	21314
SD			12	21	122	1738	4606	11704

(ｲ) シトリニン分析法の確立と汚染実態調査及びリンゴ品種のかび毒産生に及ぼす影響の調査

a　シトリニン分析法の検討

蛍光検出器（Ex 330 nm, Em 500 nm）を接続したHPLC でシトリニンのピークは他ピークと良好な分離を示した（図2404-4)。パツリンと同じ酢酸エチルを抽出溶媒とした場合にもこれまでに TLC による分析で抽出に使用例のあるクロロホルム、クロロホルム：酢酸エチル（２：１）と同様、良好な回収率が得られたことから（図2404-5)、酢酸エチルが抽出溶媒として利用可能であることがわかった。HPLC でのシトリニンの定量限界は0.6 μg/L（S/N 比10)、検出限界は0.2 μg/L（S/N 比３）とした。

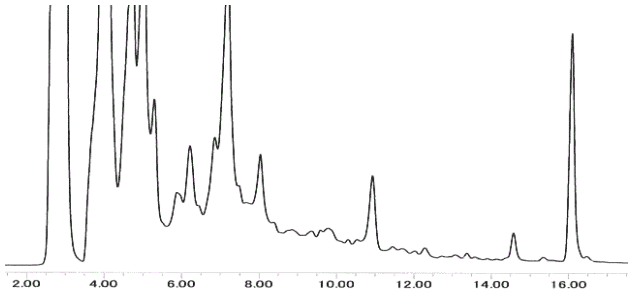


図2404-4　シトリニン添加リンゴ果汁の HPLC クロマトグラム

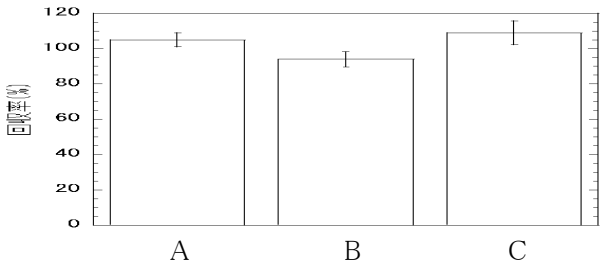


図2404-5　抽出溶媒によるシトリニン回収率の差異
A：酢酸エチル、B：クロロホルム
C：酢酸エチル＋クロロホルム

b　2005年に収集したリンゴジュース製品のパツリン及びシトリニン分析

収集したリンゴジュース製品100点のいずれについても、パツリン及びシトリニン含量は ND であった。

c　リンゴ品種のマイコトキシン産生能に及ぼす影響の調査

パツリン産生菌を接種したリンゴ果実では、貯蔵にともない病斑が拡大した。接種後12日目の果実から調製したジュースのパツリン含量は、「ジョナゴールド」が最も多く「ふじ」が最も少なかった。シトリニン含量は最も多い個体で46 μg/L であり、パツリンよりも少なかった。

エ　考　察

(ｱ) パツリン分析法の確立と汚染実態調査

HPLC 法によるパツリンの分析法について検出限界、定量限界等を求め LC-MS での確認法を含め、確立することが出来た。この方法でプロフィシエンシーテスト（FAPAS パツリンラウンド）にも継続的に参加し、分析値の信頼性の保証を受けていることから、定量法として妥当と考えられる。リンゴジュース製品のパツリン分析結果からコーデックスの基準値を超える製品は認められず、また汚染の頻度も比較的新しい海外での報告例（Leggott, N.L. and Shephard, G.S., 2001; Tangun, E.K. et al., 2003; Yurdin, T. et al., 2001）と比較して低いものと考えられるが、今後一層の汚染果の除去の徹底が必要であることが示された。リンゴ青かび病菌は接種後 6 日程度でパツリンの産生が確認され、この時の病斑は打撲果と判別される可能性もあり、この点でも果実の選別に注意が必要であることが示された。

(ｲ) シトリニン分析法の確立と汚染実態調査及びリンゴ品種のかび毒産生に及ぼす影響の調査

リンゴ果汁中のシトリニン分析に関しては、固相抽出等の前処理を行わないでも蛍光検出器を用いることにより定量が可能であった。シトリニンの存在が推定される場合には MS での確認が出来れば望ま

しいが、蛍光検出器は高感度であることからMSの種類によっては蛍光検出限界付近での確認は困難な場合もあることが推測される。

かび毒の産生にはリンゴ果実の品種も影響する可能性が示された。各品種の成分的な特徴との関連性についての確認が必要と考えられるが、これまでにパツリンの産生に関しては特定のアミノ酸や低分子化合物による産生阻害も示唆されていることから、こうしたことを含めて確認が必要と考えられる。

オ　今後の課題

(ア) パツリン分析法の確立と汚染実態調査

パツリン分析に際し、パツリンピークの近傍に未同定小さなピークが認められる場合が少なからずあることから、パツリン量が微量でMSでの確認が困難な場合には特に注意が必要である

(イ) シトリニン分析法の確立と汚染実態調査及びリンゴ品種のかび毒産生に及ぼす影響の調査

リンゴ青かび病菌（*Penicillium expansum*）は培地上では複数のかび毒を産生することが知られていることから、パツリン、シトリニン以外のかび毒についても果実での産生の確認と定量法の確立が必要である。リンゴ品種のかび毒産生に及ぼす影響に関しては、1菌株についての結果であることから、複数のリンゴ青かび病菌を用いての確認が必要である。

カ　要　約

(ア) パツリン分析法の確立と汚染実態調査

HPLC法によるパツリン分析及びLC-MSによる確認法を確立した。収集したリンゴジュース製品のパツリン分析の結果、コーデックスで採択された基準値を超える製品は認められなかったが、汚染果実除去の徹底が必要であることが示された。

(イ) シトリニン分析法の確立と汚染実態調査及びリンゴ品種のかび毒産生に及ぼす影響の調査

リンゴ果汁中のシトリニン分析については、果実でシトリニンが産生される場合があることを確認するとともに、抽出溶媒としてパツリン分析と同じ酢酸エチルが使用可能であり、蛍光検出器を接続したHPLCを用いることにより高感度に定量出来ることを明らかにした。パツリン産生菌のパツリン産生量にはリンゴ果実の品種の影響があることが示唆された。

キ　引用文献

Anderson, B., Smedsgaard, J., and Frisvad, J. C. 2004. *Penicillium expansum*: Consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurence in fruit ptoducts. *Journal of Agricultural and Food Chemisity*, 52: 2421-2428.

Leggott, NL, and GS. Shephard. 2001. Patulin in South African commercial apple products. *Food Control*, 12: 73-76.

MacDonald, S., Long, M., and Gilbert, J. 2000. Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 83, 1387-1394.

Martins, M. L., Gimeno, A., Martins, H. M., and Bernardo, F. Co-occurence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. 2002. *Food Additives and Contaminants*, 19, 568-574.

Tangni, E. K., R. Theys, E. Mignolet, M. Maudoux, J. Y. Michelet, and Y. Larondelle. Patulin in domestic and imported apple-based drinks in Belgium: occurrence and exposure assessment. *Food Additives and Contaminants,* 20(5): 482-489.

Yurdin, T., G. Z. Omurtag and O. Ersoy. 2001. Incidence of patulin in apple juices marketed in Turkey. *Journal of Food Protection,* 64: 1851-1853.

研究担当者（渡辺　満*、清水　恒）

5　国産リンゴ及び各種果物のパツリン等のカビ毒汚染に関する研究

ア　研究目的

パツリンは、マウス、ラット、ハムスター、イヌ、ニワトリ等、種々の動物に対して経口で致死的な毒性を示すカビ毒である。*Penicillium*や*Aspergillus*属の多くの種類のカビによって産生されるが、実際に食品のパツリン汚染に関与しているのは、リンゴの腐敗菌である*Penicillium expansum*であるといわれている。

ヨーロッパ、アメリカ等の諸外国では、1970年代からリンゴ加工品等のパツリン汚染が報告され(Jellinecら 1989)、規制値が設けられていた(FAO 1997)。しかし、我が国では、1995年までは、パツリンはほとんど注目されておらず、汚染報告は見あた

らなかった。そこで、我々は、1996年から我が国でのリンゴ加工品の汚染調査を開始し、リンゴ果汁からパツリンが検出されることを明らかにした。この調査結果が基礎資料となり、2002年12月、厚生労働省は、リンゴジュースに対し50 ppb の基準値が設定することを決定した(2003年11月告示、2004年６月施行)。

国内を流通するリンゴ加工品ジュースにパツリン汚染があることは明らかとなったが、国内で使用されるリンゴジュース原料用濃縮果汁は、その３/４が輸入品であるため、国産リンゴのパツリン汚染があるか否かについては不明である。そこで、国産リンゴのパツリン汚染の可能性を把握するため、リンゴ圃場等から採取した *Penicillium* 属菌についてパツリン産生能を調査するとともに、菌による自然感染又は損傷を受けたリンゴのパツリン汚染の有無を調査し、国産リンゴのパツリン自然汚染の実態を把握する。

また、パツリンの汚染報告は主にリンゴに関するものであるが、リンゴ以外の果物のパツリン汚染の可能性は不明であり、明らかにする必要がある。ブドウについては、腎毒性を有するカビ毒であるオクラトキシンの検出が海外から報告されており、EU ではブドウ加工品に対して規制値も設定されている。そこで、各種果物について、パツリン以外のカビ毒についても汚染の可能性を把握する。

イ　研究方法

(ｱ) リンゴ中のパツリン分析法の確立

我々が開発したリンゴ果汁中のパツリン分析法をもとに、リンゴ中のパツリンを正確に定量及び確認できる方法を確立する。

(ｲ) *Penicillium* 属菌のリンゴにおけるパツリン産生能の調査

東北地域のリンゴ圃場の土壌またはリンゴから分離した *Penicillium* 属菌を新鮮なリンゴに接種して室温(20℃前後)で培養後、パツリン含有量を測定し、菌のパツリン産生能について調査する。

(ｳ) 国産リンゴのパツリン汚染調査

リンゴ加工工場より、自然に腐敗・損傷を受けたリンゴを採集し、*Penicillium* 属菌を分離してパツリン産生能を調査するとともに、パツリン含有量を調査する。

(ｴ) 各種果物中のパツリン及びその他のカビ毒の分析法の確立

我々が開発した GC/MS によるリンゴ加工品中のパツリン分析法をブドウ、洋ナシに適用し、パツリンを高感度に分析(定量、確認)できるか否かを調査する。また、現在我々が穀類等に適用しているオクラトキシン A､B 及びシトリニンの HPLC による同時分析法について、ブドウ加工品を用いて回収率、感度を調査する。検出された際の確認法として LC/MS/MS を使用する方法を検討する。

ウ　研究結果

(ｱ) リンゴ中のパツリン分析法の確立

リンゴジュース用に開発した方法(田端ら2004)を一部変更してリンゴ中のパツリン分析法を確立した(図2405-1)。すなわち、リンゴ50 g に水及び食塩を加えて軽くホモジナイズした後、酢酸エチルを加えて抽出した。抽出液を濃縮し、その一部にヘキサンを加えて夾雑物質を析出させてろ過により除去した後、固相抽出により、さらに精製した。BSTFA でシリル化後 GC/MS に注入し、SIM モードで定量を、SCAN モードによるマススペクトルにより確認を行った。リンゴにパツリンを50 ppb 添加したときの本法による回収率は85%と良好であった。

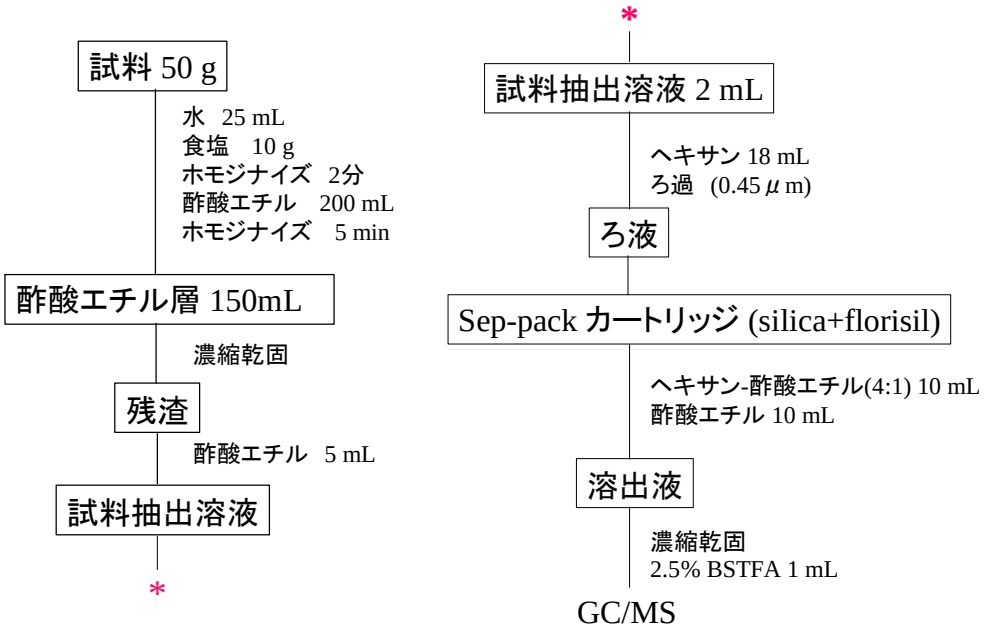


図2405-1　リンゴ中のパツリン分析法

(ｲ) *Penicillium* 属菌のリンゴにおけるパツリン産生能

リンゴに傷を付け、圃場の土壌に接触させた後、室温で培養したリンゴから分離した *Penicillium* 属菌のパツリン産生能を調査した。試験を行った13菌株中11菌株は、接種したリンゴに写真2405-1のような病変を起こし、病変部についてパツリンを測定したところ、高濃度のパツリンが検出され、高いパツリン産生能を有することが分かった。その他、付傷したリンゴから分離された *Penicillium* 属菌にも高いパツリン産生能を有するものがあり、リンゴが圃場の土壌菌に感染した場合、パツリンに汚染される可能性が高いことがわかった。また、リンゴ加工工場で採集した廃棄リンゴから分離した *Penicillium* 属菌も、高頻度で高いパツリン産生能を有することがわかった。

写真2405-1　*Penicillium* 属菌接種により病変したリンゴ

(ｳ) 国産リンゴのパツリン汚染調査結果

リンゴ加工工場では、図2405-2に示すような工程でリンゴジュースが作られ、原料リンゴのうちで損傷の特にひどい部分は、選別時に切り取られ、廃棄される。選別前の段階で、自然に腐敗または鳥、虫、打撲等により損傷を受けたリンゴやリンゴ片(写真2405-2)を200個以上採取し、カビの分離を行うと共にパツリン含有量を調査した。その結果、多くの試料から *Penicillium* 属菌が検出され、そのほとんどが強いパツリン産生能を有した。また、鳥害、打撲等の損傷または腐敗の見られた試料の一部から高濃度のパツリンが検出された。本調査により国産リンゴにも、一部に高濃度のパツリン自然汚染があることが判明した。

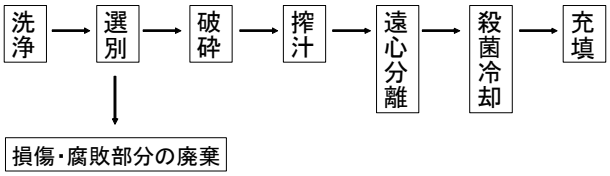


図2405-2　リンゴジュース製造工程

写真2405-2　自然腐敗、損傷リンゴ

(ｴ) 各種果物中のパツリンの分析法の確立

分析法の検討を行った結果、我々が開発したGC/MSによる分析法を改良することにより、リンゴの他にブドウ等についても回収率も良好で、パツリンを5 ppbまで定量及び確認することができた。

(ｵ) 各種果物中のオクラトキシン及びシトリニンの分析法の確立

現在我々が穀類等に使用しているHPLCによるオクラトキシンA、B及びシトリニンの同時分析法(図2405-3, 4)を各種ブドウ加工品に適用したときの回収率は、オクラトキシンAで99～109%、オクラトキシンBで99～112%、シトリニンで74～83%と良好であった(表2405-1)。また、各トキシンとも0.1 ppbまで測定することができ、感度の面でも十分満足できるものであった。さらに、LC/MS/MSを使用することにより、それぞれ0.1 ppbまで確認することができた。

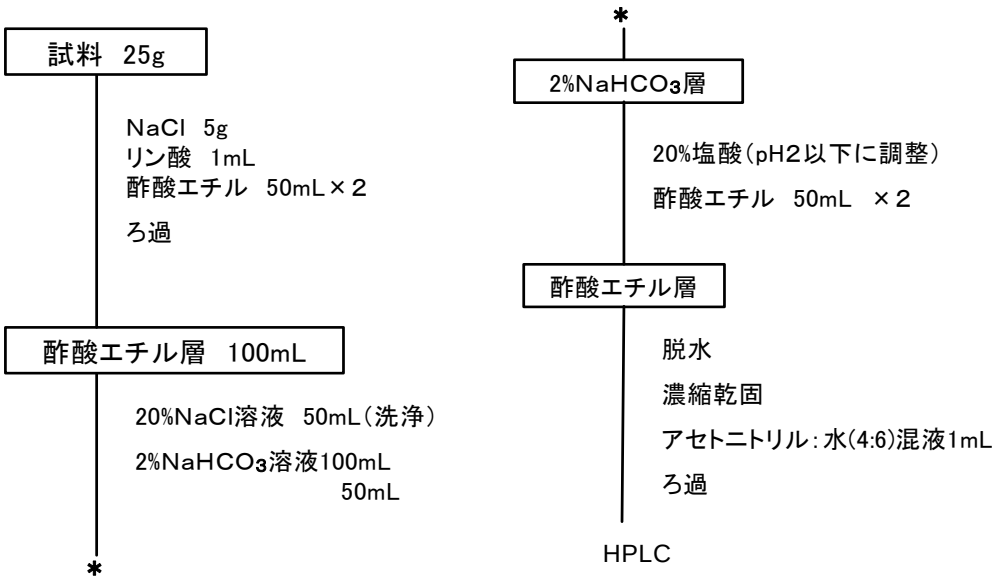


図2405-3　オクラトキシン、シトリニン同時分析法

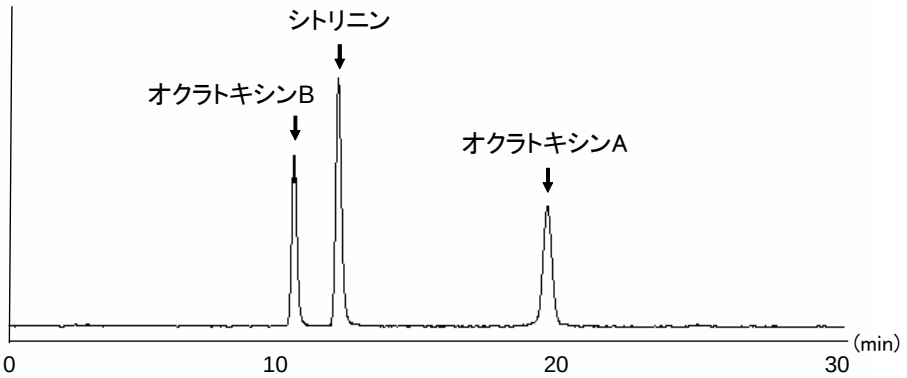


図2405-4　オクラトキシン、シトリニンの液体クロマトグラム

カラム：オクタデシル化シリカゲル(5 μm, 4.6 mm i.d. x250 mm)、カラム温度：40℃、
移動相：アセトニトリル・0.015 Mシュウ酸(4：6)、流速：1 mL/min、
検出：蛍光（励起330 nm、蛍光490 nm）

試料	回収率(%)		
	OchA	OchB	Cit
ブドウジュース1	98.7	99.6	75.9
ブドウジュース2	101.0	99.0	76.2
ブドウジュース3	99.3	102.3	77.0
白ワイン1	104.8	106.5	80.7
白ワイン2	102.5	102.1	74.1
白ワイン3	105.3	106.0	74.0
赤ワイン1	108.7	112.2	81.3
赤ワイン2	104.1	110.5	80.3
赤ワイン3	104.2	110.4	83.0

表2405-1　オクラトキシン・シトリニン添加回収試験結果

エ　考　察

(ア) 各種果物中のパツリン等のカビ毒の分析法

リンゴ及びその他の果物やその加工品について、パツリン、オクラトキシンAとB及びシトリニンの分析法を確立することができた。回収率、感度共に良好であるため、今後、各種条件での産生能の差や、汚染実態調査に有効であると考えられる。

(イ) 国産リンゴのパツリン汚染

リンゴ圃場、及びリンゴから採取した *Penicillium* 属菌に強いパツリン産生能があり、また、実際に国産リンゴからパツリンが検出されたことから、リンゴの取り扱い、保存条件には注意を要すると考えられる。また、リンゴジュース製造工場での原料リンゴの選別には注意を払う必要がある。

オ　今後の課題

(ア) リンゴ以外の果物のパツリン汚染の可能性の把握

今後、モモ、ベリー等、果物の種類を増やしてパツリン等のカビ毒汚染の可能性を探る必要がある。カビ毒が産生されることが分かった果物については、産生に適した条件、適さない条件を検索する。また、果物の種類によりカビ毒の産生の傾向に差があるかについて調査する。

(イ) 各種果物のカビ毒汚染実態の把握

各種果物について、パツリン、オクラトキシンA、B及びシトリニンの汚染実態調査を行い、菌を接種した結果と実際の自然汚染調査結果の比較を行う。

また、果物の種類によりカビ毒汚染の状況が異なるか否かを調査し、その原因を検索することにより、リンゴ等実際に自然汚染のある果物のカビ毒汚染を制御する可能性を探る必要がある。

カ　要　約

(ア) 各種果物中のパツリン等のカビ毒の分析法

リンゴ及びその他の果物やその加工品について、パツリン、オクラトキシンAとB及びシトリニンの分析法を確立することができた。それぞれ、回収率、感度共に良好であった。

(イ) 国産リンゴのパツリン汚染

リンゴ圃場の土壌及びリンゴから分離された *Penicillium* 属菌は、強いパツリン産生能を有するものが多かった。リンゴ加工工場で選別前のリンゴの一部からパツリンが検出され、国産リンゴにもパツリン汚染があることが判明した。

キ　引用文献

FAO 1997. Worldwide regulations for mycotoxins 1995. A compendium, FAO Food and Nutrition Papers, Number 64, 7-38

Jelinec ら 1989. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds-update. J Assoc Off Anal Chem, 72: 223-230

田端節子ら 2004. A Quantification and Confirmation Method of Patulin in Apple Juice by GC/MS. 食品衛生学雑誌 45:245-249

研究担当者（田端節子*、飯田憲司、岩崎由美子、木村圭介、鈴木仁、安田和男）

6　穀物に含まれるフモニシン類の測定技術の開発

ア　研究目的

1988年に同定されたかび毒・フモニシンは、フザリウム属かびが産生する毒素で、ヒトで発ガン性の疑いがあり、諸外国で特にトウモロコシの汚染が問題になっている（International Agency for Research on Cancer 2002）。国内で流通している穀類についてフモニシン汚染が調べられた例は少ないが、トウモロコシ以外の穀物でも低レベルでのフモニシン汚染が懸念されている。本課題では、フモニシン汚染の簡便かつ高感度な検出技術を開発し、汚染実態調査に資するツールを提供することを目的とする。

イ　研究方法

これまでにトウモロコシ中フモニシン B_1，B_2，B_3（FB_1，FB_2，FB_3）については公認分析法であるAOAC995.15法が有る（AOAC INTERNATIONAL 2003）。しかし、サブサンプル量が大きく、精製に時間を要するため、まずこの前処理法を改変して効率化をはかった。同時に国際的分析技能試験に参加し、改変法の妥当性確認を行った。次いで、AOAC995.15法指定の定量法であるHPLC-蛍光検出法の高感度化、ならびに新たなLC-タンデム質量分析法（LC-MS/MS法）を用いたさらに特異的かつ高感度な検出・定量系の検討を行った。

(ｱ) フモニシン類抽出用サブサンプル量のスケールダウン

AOAC995.15法記載のサブサンプル量ならびに抽出溶媒比の改変により、多検体の処理に適した抽出法を開発した。AOAC995.15法記載法ならびに改変法を用いて自然汚染トウモロコシ中のフモニシン量を定量し、各定量値を比較することにより、サブサンプル量のスケールダウンが可能であるか検討した。

(ｲ) フモニシン類精製用の固相抽出カートリッジの検討

AOAC995.15法の精製過程の一部改変により、より簡便な前処理法を開発した。AOAC995.15法記載法ならびに改変法を用いて添加回収試験を行い、各方法でのフモニシン類の回収率の比較により、精製法の改変が可能であるか検討した。コメサンプルでトウモロコシ同様、添加回収試験を行った。

(ｳ) AOAC995.15法の改変法の妥当性確認

上で開発した改変法に関し、国際的分析技能試験制度であるFAPASに参加して、その妥当性を確認した。

(ｴ) フモニシン類定量法の高感度化

AOAC995.15法記載の定量法であるHPLC-蛍光法の高感度化とともに、さらに高感度なLC-タンデム質量分析法（LC-MS/MS法）を検討した。

ウ　研究結果

(ｱ) フモニシン類抽出用サブサンプル量のスケールダウン

トウモロコシ中フモニシン類の公認分析法であるAOAC995.15法指定の抽出法では、抽出時のサブサンプル量が50 gとやや大きく、また抽出溶媒比が2倍（100 ml）と小さいため、抽出上清に濁りを生じやすく、多検体の処理には問題があった。そこで、抽出時のサブサンプル量を減らし、かつ抽出溶媒比を上げることで、公認法と同等の抽出効率が得られるかを検討した結果、サブサンプル量10 g/抽出溶媒50 mlでも、AOAC995.15法（サブサンプル量50 g/抽出溶媒100 ml）と有意差の無い結果が得られた（表2406-1）。

表2406-1　各種サブサンプル量/抽出溶媒量における定量値

（ppm, n=5, 自然汚染ﾄｳﾓﾛｺｼ試料）

	50 g/100 ml	50 g/250 ml	20 g/100 ml	10 g/50 ml
FB_1	1.84 ± 0.05	2.03 ± 0.17	1.87 ± 0.16	2.01 ± 0.08
FB_2	0.67 ± 0.04	0.85 ± 0.08	0.73 ± 0.09	0.83 ± 0.07
FB_3	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.26 ± 0.01

(ｲ) フモニシン類精製用の固相抽出カートリッジの検討

フモニシン類の精製には市販の固相抽出カートリッジ（SPE）が用いられる。AOAC995.15法指定のSPEであるBond Elut-SAX（Varian社）を指示通りに使用した場合、サンプル負荷前のSPEの平衡化な

らびに溶出後の処理（溶出液10 ml の濃縮乾固）に時間がかかるため、精製法についても多検体の処理に適した方法が必要であった。そこで、市販の SPE のうち、使用前平衡化が不要とされている Sep-pak QMA（Waters 社）を用い、溶出量を半減することにより、精製時間の短縮をはかった結果、改変した方法でも、70%以上の回収率が得られた（表2406-2）。

表2406-2　各種固相抽出カートリッジ使用法における回収率

（%，n=3，0.5 ppm 添加 ブランク米試料）

	Bond Elut-SAX 使用前平衡化(+)		Sep-Pak QMA 使用前平衡化(+)		Sep-Pak QMA 使用前平衡化(-)	
	分画1 (0-5 mL)	分画2 (5-10 mL)	分画1 (0-5 mL)	分画2 (5-10 mL)	分画1 (0-5 mL)	分画2 (5-10 mL)
FB_1	75.3 ± 2.1	7.4 ± 0.4	71.2 ± 0.4	10.6 ± 0.9	72.7 ± 1.0	13.6 ± 2.3
FB_2	70.1 ± 1.7	5.9 ± 0.3	74.2 ± 1.7	9.8 ± 0.3	74.8 ± 0.7	14.9 ± 4.1
FB_3	69.6 ± 0.2	5.7 ± 0.3	71.9 ± 1.0	9.1 ± 0.3	71.9 ± 0.4	10.8 ± 1.9

(ウ) AOAC995.15法の改変法の妥当性確認

(ア)(イ)で開発した方法に関し、国際的分析技能試験制度である FAPAS（英国セントラルサイエンスラボ提供、トウモロコシ中フモニシン B_1 と B_2）に参加した結果、分析値の z-スコアが絶対値2以内であり、開発した方法の妥当性が確認できた。

(エ) フモニシン類定量法の高感度化

AOAC995.15法記載の定量法である HPLC-蛍光法の高感度化をはかった結果、プレラベル蛍光誘導体化試薬とサンプルの反応量比を変えることで、より高感度な分析ができた（0.05-5.0 μg/ml）（図2406-1）。また、さらに高感度な LC-タンデム質量分析法（LC-MS/MS 法）を試みた結果、移動相条件の検討により、感度が約10倍高い分析が可能となった（0.005-1.0 μg/ml）（図2406-2）。

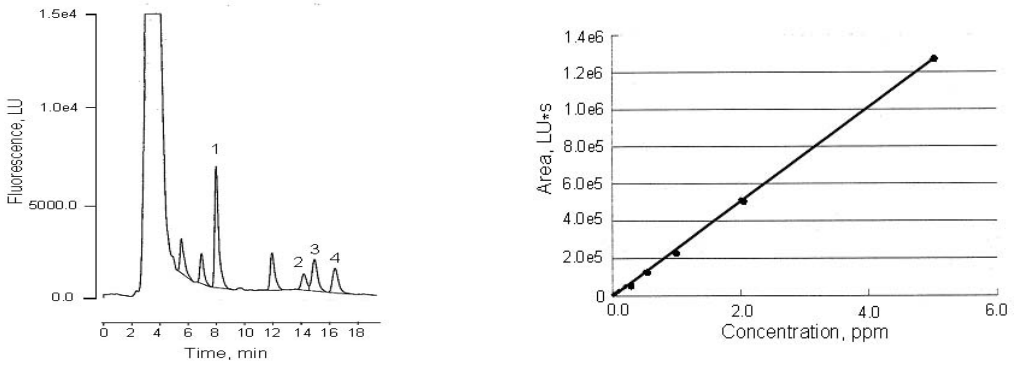


図2406-1　フモニシン類の HPLC-蛍光分析クロマトグラム（1：FB_1, 2：3-epi FB_3, 3：FB_3, 4：FB_2）と検量線（FB_1）

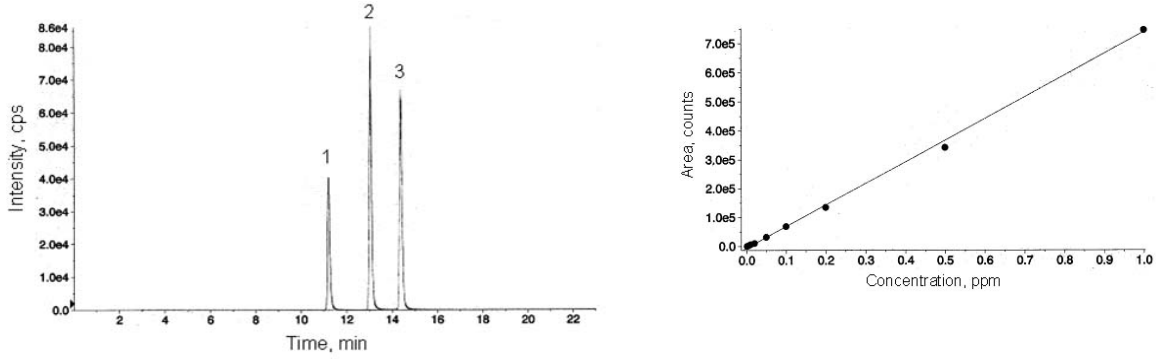


図2406-2　フモニシン類の LC-MS/MS 分析クロマトグラム（1：FB_1, 2：FB_3（3-epi FB_3 との混合），3：FB_2）と検量線（FB_1）

エ　考　察

(ア) フモニシン類分析における簡便な前処理法の開発とその妥当性確認

サブサンプル量10 g/抽出溶媒50 ml でも、AOAC995.15法（サブサンプル量50 g/抽出溶媒100 ml)と有意差の無い分析値が得られたことより、抽出用サブサンプル量を50 g から10 g にスケールダウンすることが可能と考えられた。また精製用の固相抽出カートリッジの種類と使用法検討により、Sep-Pak QMA カートリッジに平衡化無しで抽出上清を負荷後、半量の 5 ml 溶出でも良好な回収率が得られたことから、精製の簡易化が可能と考えられた。上記2点を改変した前処理法を SOP として、国際的分析技能試験制度である FAPAS（英国セントラルサイエンスラボ提供、トウモロコシ中フモニシン B_1とB_2）に参加した結果、分析値の z-スコアが絶対値 2 以内であり、開発した方法の妥当性が確認できた。

(イ) フモニシン類定量法の高感度化

LC-MS/MS 法の検討により、従来の HPLC-FL 法に比べ、より特異的かつ高感度な分析を行うことが可能となった。トウモロコシならびに精白米では、HPLC-蛍光分析法に比べ、約10倍高感度な検出が可能であった。

オ　今後の課題

(ア) 他のマトリクスの検討

今回、トウモロコシ以外に検討したマトリクスは、精白米であるが、他のマトリクスに関してさらに検討を進め、今回確立したフモニシン類分析法の応用範囲を広める。

(イ) LC-MS/MS 法による定量法の妥当性確認

LC-MS/MS 法による分析値の信頼性を確保するために、併行再現性、日間再現性試験を各マトリクスで行う。

カ　要　約

国内で流通している穀類のフモニシン汚染が懸念されるため、その実用的な検出・定量系の検討を行った。まず AOAC995.15法の抽出法、精製法を改変することにより、公認法よりも効率的な前処理法を開発した。次に、LC-MS/MS 法の検討により、従来のHPLC-蛍光法に比べ、より特異的かつ高感度な分析を行うことが可能となった。

(ア) AOAC995.15法の改変による効率的な前処理法の開発

抽出法の検討により、サブサンプル量を小さくすることができた。また精製法に関し、抽出上清をSep-Pak QMA カートリッジに平衡化無しで負荷後、半量の 5 ml 溶出により良好な回収率が得られたことから、精製時間を大幅に短縮することができた。国際的分析技能試験により簡易化した前処理法の妥当性を確認した。

(イ) LC-MS/MS 法によるフモニシン類の高感度検出法の開発

トウモロコシと精白米で、AOAC995.15法指定のHPLC-蛍光法に比べ、約10倍高感度なフモニシン類の検出が可能となった。

キ　引用文献

AOAC INTERNATIONAL 2003. AOAC Official Method 995.15. Fumonisins B_1, B_2, and B_3 in Corn. Liquid Chromatographic Method. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL 第 17 版 . AOAC INTERNATIONAL. (CD-ROM),

International Agency for Research on Cancer 2002. Fumonisin B_1. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some traditional medicines, some mycotoxins, naphthalene and stylene. IARC. 82:301-366.

研究担当者（久城真代*、田中健治）

7　マイコトキシンの分析法の開発と汚染防止技術の開発

ア　研究目的

ムギが赤かび病に罹病すると、それ自体でムギの品質劣化となるが、トリコテセン骨格を有したデオキシニバレノール（DON）やニバレノール（NIV）などのかび毒（マイコトキシン）も産生されることから、注意が必要である。マイコトキシンの簡易分析法や精密分析法の開発を行うとともに、コムギやイネの赤かび病によるマイコトキシンの産生を抑制するような条件を見出し、マイコトキシン汚染の抑制技術を開発する。また、最近の分析機器により、コメ粒に汚染の可能性のあるステリグマトシスチン（STE）とアフラトキシン B1（AFB1）の分析法の開発を行う。

イ　研究方法

(ア) DON 用に用いられている Romer 社製のデオキシニバレノール用のミニカラムであるマルチセップ

#227を使用し、DON、NIV および3-アセチルーデオキシニバレノール（3-Ac-DON）の40 mg を 5 g のコムギ粒に添加し（ 8 ppm）、また、フザレノンーX（Fus.-X）の80 mg を 5 g のコムギ粒に添加して、簡易に抽出できるかどうかを検討した。さらに、トリコテセンをその倍量添加した回収実験も行った。

(ｲ) トリコテセン系マイコトキシンをガスクロマトグラフ（GC）で検出するために、トリメチルシリル化剤（TMS 化剤）とヘプタフルオルイミダゾール（HFBI）誘導体化試薬を検討した。分析は、電子捕獲検出器（ECD）付き GC で行った。

(ｳ) 種々の品種のコムギを用い、農薬散布をしたコムギ粒と散布をしていない実験区のコムギ粒を分析し、コムギの赤かび病抵抗性とマイコトキシンの産生性および農薬の散布効果を検討した。

(ｴ) 農薬を散布しなかった場合の、各品種コムギ粒のトリコテセンの産生量を分析した。

(ｵ) コメ粒からのマイコトキシンの抽出と分析法の検討。

倒伏し水に浸かった日本産コメ粒からのトリコテセン系マイコトキシンの検出を試みた。また、コメに汚染の可能性のある STE と AFB1について、精製法を検討し、GC やフォトダイオードアレイ検出器（DAD）と蛍光検出器（FLD）を用いた HPLC で分析した。

ウ　研究結果

(ｱ) Romer 社製の DON 用のミニカラムであるマルチセップ#227を使用すると、8 ppm となるように添加したコムギ粒では表2407-1上段のように、DON、3-Ac-DON、Fus.-X それに NIV のいずれもほぼ100%の回収率を得た。また、上記の 2 倍量添加した回収実験での回収率を表2407-1の下段に示したが、同様に高い回収率を得た。そこでこのカラムは3-Ac-DON、Fus.-X および NIV の精製にも使えることがわかった。

表2407-1　トリコテセンの添加と回収率（%）

DON	3-Ac-DON	Fus.-X	NIV
111	97.6	98.8	101
97.4	97.6	97.6	93.4

上段は、DON、 3-Ac-DON それに NIV の場合には、40 mg を 5 g のコムギ粒に添加、Fus.-X の場合には、80 mg を 5 g のコムギ粒に添加
下段は、その倍量添加

(ｲ) TMS 化剤では、DON、3-Ac-DON、Fus.-X それに NIV は検出測定できたが、T-2トキシン（T-2）は、検出できなかった。HFBI は、T-2の誘導体化には良いが、DON、3-Ac-DON、Fus.-X それに NIV の検出には、多くの他のピークができ、分析は困難であった。T-2のクロマトグラムを図2407-1に示した。

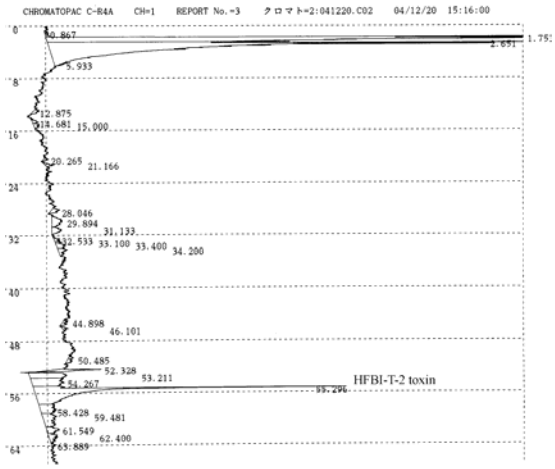


図2407-1　HFBI で誘導体化した T-2トキシンのガスクロマトグラム

(ｳ) 抵抗性品種とトリコテセン産生の関係を検討した。結果を図2407-2および図2407-3に示した。図中のコムギ品種は、左側が抵抗性が最も強く、右側に行くほど抵抗性が弱くなるように並べている。農薬を散布しなかった場合には、赤かび病に抵抗性の強い延岡坊主小麦には DON は少なかったが、抵抗性が中位である農林61号やあやひかりで DON は、延岡坊主小麦より多く産生された。しかし、さらに赤かび病に抵抗性が弱いゴガツコムギでは、DON の産生量はほとんど認められなかった。農薬を散布した場合には、赤かび病に抵抗性が中位のあやひかりの場合、抵抗性が強い延岡坊主小麦より DON の産生量が少なかった。このように、赤かび病抵抗性と DON の産生量は必ずしも一致しなかった。また、農薬を散布することにより、延岡坊主小麦や農林61号のように NIV の産生が多くなるものも認められた。

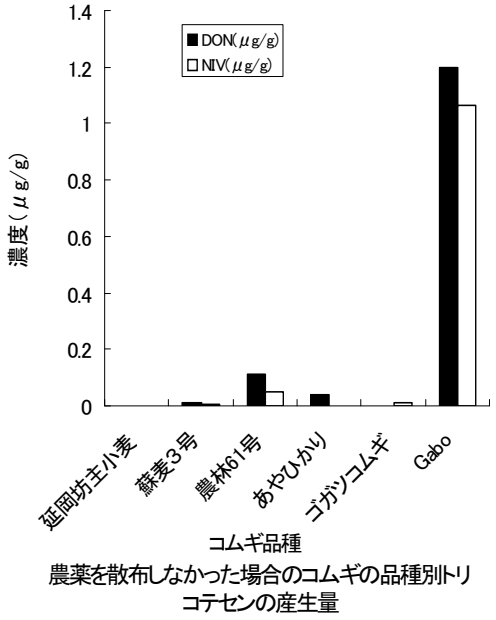


図2407-2　農薬を散布しなかった場合のコムギの品種別トリコテセンの産生量

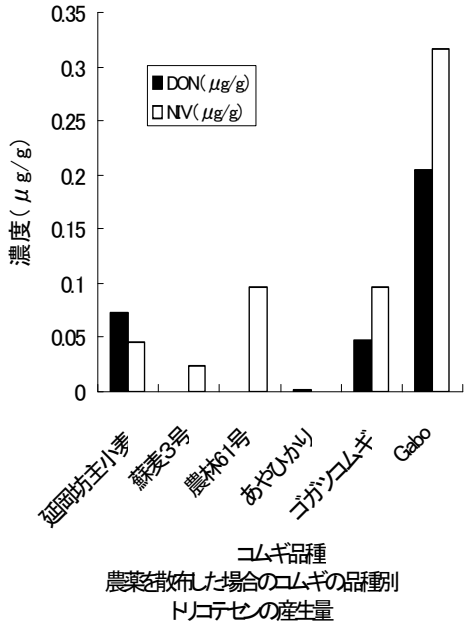


図2407-3　農薬を散布した場合のコムギ品種別トリコテセンの産生量

(ｴ) 供試品種として関東107号、西海168号のコムギ 2 品種をさらに加えて、抵抗性品種とトリコテセン産生の関係を検討した。赤かび病に対して中位の抵抗性を示す農林61号やあやひかりでは、DON も NIV も検出されなかった（図2407-4)。前の(ｳ)で見られたように、抵抗性品種が必ずしも DON や NIV の産生性が低いというのではないということがここまでの実験結果から、明らかになった。

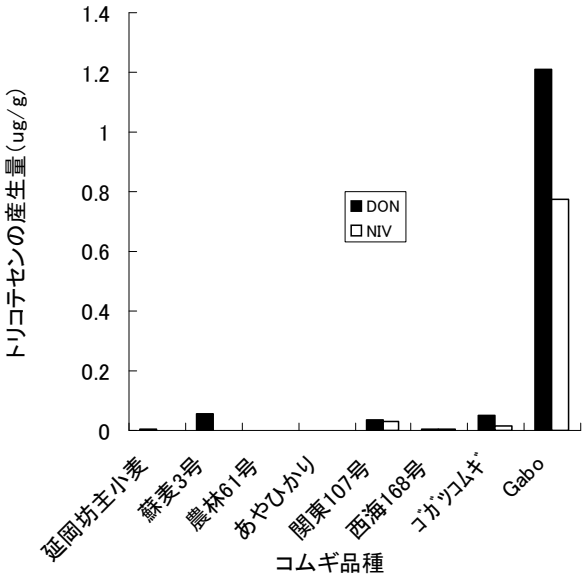


図2407-4　農薬を散布しなかった場合のコムギの品種別トリコテセンの産生量

(ｵ) コメ粒からのマイコトキシンの抽出と分析法の検討。

倒伏し水に浸かった日本産コメ粒から、DON、Fus.-X、NIV が検出された。また、コメ粒からの STE と AFB1の分析を行い、STE を、オートプレップカラムで精製すると、良好な精製ができた。STE の分析には、HPLC の方が GC-MS より感度が高かったので、HPLC を用いることにした。HP 製の HPLC を使用し、STE を分析し DAD で検出すると、0.20 ng から検出出来た。この条件で、AFB1との同時分析も可能となった。AFB1を無水トリフルオロ酢酸で処理（TFA 化）し、FLD で検出すると、AFB1を、0.0010 ng まで検出できた（表2407-2)。

表2407-2　ステリグマトシスチン（STE）とアフラトキシンB1（AFB1）の検出

	濃度(ng/20 μl)	DAD 高さ(mAU)		FLD 高さ(LU)	
		TFA化	MeOH溶液	TFA化	MeOH溶液
STE	0.02000	ND	ND	ND	ND
	0.20000	0.06	0.09	ND	ND
	2.00000	0.76	0.96	ND	0.008
	20.00000	6.38	10.13	ND	0.05
AFB_1	0.00020	ND	ND	ND	ND
	0.00100	ND	ND	0.011	ND
	0.00010	ND	ND	0.016	ND
	0.01000	ND	ND	0.086	ND
	0.02000	ND	ND	0.17	ND
	0.20000	0.05	ND	1.79	0.03
	2.00000	0.42	0.26	19.04	0.34
	20.00000	5.38	2.91	247.74	3.75

エ　考　察

(ア) マイコトキシンの分析法の開発

Romer 社製の DON の抽出液の精製用のミニカラムであるマルチセップ#227を使用すると、DON だけでなく3-Ac-DON、Fus.-X および NIV を短時間でほぼ100%の回収率をもつ精製ができ、分析の効率化が図られた。トリコテセン系マイコトキシンを GC で検出するための誘導体化試薬について検討したが、DON、3-Ac-DON、Fus.-X および NIV の誘導体化には TMS 化剤が、T-2の誘導体化には HFBI が適していた。しかし、これら 2 群は分けて定量する必要がある。STE の分析には DAD 付きの HPLC で、 AFB1の検出には TFA 化して FLD 付きの HPLC で分析すると感度良く分析できた。

(イ) マイコトキシン汚染防止技術の開発

コムギ品種を赤かび病に対する抵抗性品種から感受性品種まで用いて、DON 及び NIV の産生を比較してみた結果、赤かび病に強い抵抗性品種が必ずしも DON や NIV の産生が少ないのではないという結果を得た。今後の DON や NIV 汚染防止を図る上で、有用な知見を得たと考えている。

オ　今後の課題

(ア) マイコトキシンの分析法の開発

DON、3-Ac-DON、Fus.-X、NIV それに T-2を、同時に分析できるような分析法の開発が望まれる。

(イ) マイコトキシン汚染防止技術の開発

赤かび病に対して抵抗性の品種にこだわらず、種々のコムギ品種を用いて、DON、3-Ac-DON、Fus.-X、NIV などのトリコテセン系マイコトキシンができにくい品種を選抜することが必要である。また、効果的な防除法もあわせて検討する必要がある。コメ粒のトリコテセン系マイコトキシン汚染防止もはかる必要がある。

カ　要　約

(ア) マイコトキシンの分析法の開発

DON の抽出液の精製に用いられている Romer 社製の DON 用のミニカラムであるマルチセップ#227を使用し、DON、3-Ac-DON、Fus.-X および NIV の精製を試みた結果、短時間でほぼ100%の回収率をもつ精製ができた。トリコテセン系マイコトキシンをガスクロマトグラフで検出するために、TMS 化剤および HFBI を用いて、DON、3-Ac-DON、Fus.-X、NIV それに T-2の同時定量を試みたが、うまくいかなかった。前 4 者と T-2は分けて分析する必要がある。STE と AFL は同時分析ができたが、AFB1の検出には TFA 化して FLD 付きの HPLC で分析すると感度良く分析できた。

(イ) マイコトキシン汚染防止技術の開発

コムギ品種を赤かび病に対する抵抗性品種から感受性品種まで用いて、DON 及び NIV の産生を比較してみた結果、赤かび病に強い抵抗性品種が必ずしも DON や NIV の産生が少ないのではないという結果を得た。倒伏し水に浸かった日本産コメ粒から、DON、Fus.-X、NIV が検出された。

キ　引用文献

1)　齊藤初雄・佐藤　剛・田中健治 2003. コムギ赤かび病被害粒におけるマイコトキシン産生量の品種間差異. 日植病報. 69：40-41.

2）田中健治・佐藤　剛・齊藤初雄 2003. 農薬を散布した場合のトリコテセン系マイコトキシンの産生性. 日植病報. 69:282-283.
3）Kenji Tanaka, Hidetaka Kobayashi, Tadahiro Nagata, and Masaru Manabe 2004. Natural occurrence of trichothecenes on lodged and water-damaged domestic rice in Japan. J. Food Hyg. Soc. Japan. 45(2):63-66. （食品衛生学雑誌）

研究担当者（田中健治*、齊藤初雄）

8　穀類のマイコトキシン汚染の網羅的モニタリング技術の開発

ア　研究目的

マイコトキシンはカビが産生する毒性物質であり、自然界に300種類以上あるといわれている。近年の輸入食品の増大にともなうカビ発生問題が顕在化し、マイコトキシンのリスクも問題になっている。既に特定の農作物で汚染が問題となっているマイコトキシンに関してはELISA法（酵素免疫測定法）やHPLCによる分析法が実用化されているが、ELISA法では一度の測定では特定のマイコトキシンの検出しかできず、複数のマイコトキシンの同時分析は不可能である。また、HPLCでも実際の農作物試料においてはカビの代謝物や農作物の成分由来の多数のピークがクロマトグラム上に現れることが多いため、保持時間だけでマイコトキシンを識別・定量するのは困難である。既知のマイコトキシンの汚染をあらゆる農作物について網羅的にモニタリングできる手法開発が強く望まれている。本研究では、高速液体クロマトグラフ質量分析装置（LC-MS）を用いたマイコトキシンの網羅的モニタリング技術の開発を目指す。

イ　研究方法

(ｱ) マイコトキシンのMSスペクトルの測定

各種マイコトキシンの市販標品を購入し、正確に重量を測定した後にアセトニトリルに溶解したものを保存溶液とした。これを適宜同溶媒で希釈して最終的に10 ppmの濃度になるよう、10 ml容の褐色メスフラスコを用いて定容した。この溶液についてLC-MS分析をスキャンモードで行った。LC-MS装置はLC-MS2010Aシステム（島津製作所）を使用し、LC分離カラムには逆相カラム（C18カラム）を使用した。イオン源には大気圧光イオン化（APPI）*1インターフェースを使用した。また、オートインジェクターを使用し、注入量は1 μlとした。

(ｲ) マイコトキシンの同時分析

スキャンモードでのLC-MS分析によって得られたMSスペクトルデータに基いて、各種マイコトキシンを検出する際に用いるイオン（モニターイオン）を決定した。モニターイオンの選択基準としては、イオン質量が100以上で元の分子量に近く、なるべくシグナル強度が強いものを採用した。Na^+付加体イオンなどは生成量の定常性に疑いが持たれたので、極力対象から外すようにした。モニターイオンを決定した各々のマイコトキシンについて、イ－(ア)で調製した保存溶液の一部を1つのメスフラスコ（褐色、10 ml容）中に分取し、アセトニトリルで定容して各マイコトキシンを2 ppmの濃度で含む混合溶液を調製した。これについてSIMモードによるLC-MS分析を行い、同時検出を試みた。注入にはオートインジェクターを使用し、注入量は6 μlとした。

ウ　研究結果

(ｱ) マイコトキシンのMSスペクトルの測定

各種マイコトキシンの10 ppm溶液を用いてLC-MS分析をスキャンモード*2で行い、得られたMSスペクトルに基いてモニターイオンを決定した。例として、アフラトキシンB1について得られたMSスペクトルデータを示す（図2408-1）。この場合は313^+をモニターイオンとして選択した。同様にして各種マイコトキシンについてモニターイオンを決定した。各マイコトキシンに対して決定したモニターイオンを表2408-1に示す。

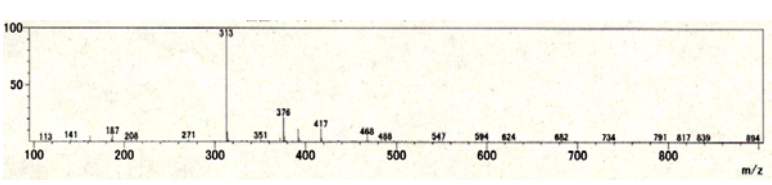


図2408-1　アフラトキシンB1のLC-MSスペクトル

(ｲ) マイコトキシンの同時分析

複数のマイコトキシンを2 ppm の濃度で含む混合溶液を調製し、これを 6 μl 注入して SIM モード*3 による LC-MS 分析を行った。その結果、アフラトキシン 4 種（B1、B2、G1、G2)、ステリグマトシスチン、オクラトキシン A、ゼアラレノン、パツリンの 8 種類のマイコトキシンについて同時検出が可能であることが明らかになった（図2408-2）。一方、デオキシニバレノールやニバレノールなどの一部のトリコテセン系マイコトキシンについては、他のマイコトキシンと同時分析する条件下では十分な感度が得られなかった。このため、今回は対象外とした。

表2408-1　各マイコトキシンのモニターイオン

マイコトキシン名	モニターイオン
アフラトキシンB1	313+
アフラトキシンB2	315+
アフラトキシンG1	329+
アフラトキシンG2	331+
ステリグマトシスチン	325+
オクラトキシンA	404+，403+
ゼアラレノン	319+，317−
パツリン	153−，154−

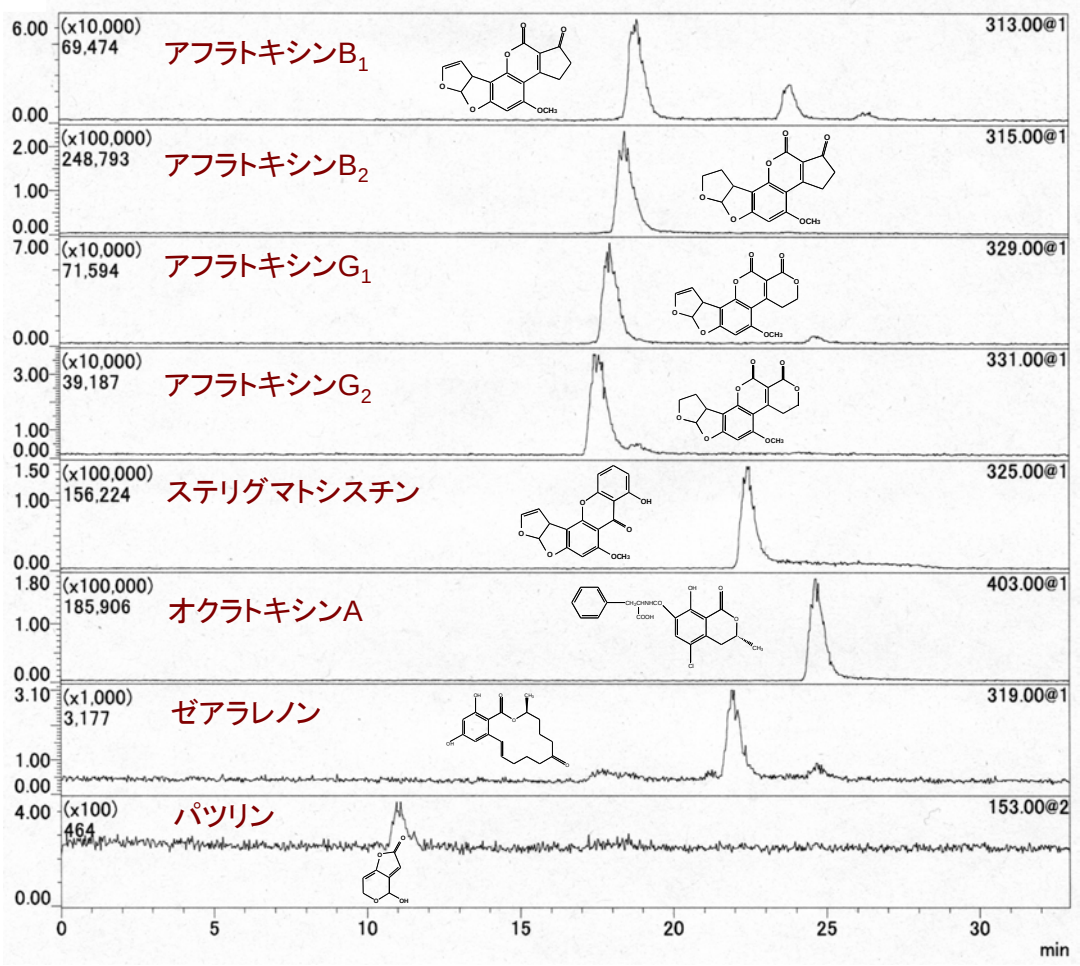


図2408-2　LC-MS によるマイコトキシンの同時分析

＊1 ：大気圧光イオン化（APPI）インターフェースは、サンプルを紫外光でイオン化するイオン源。低極性化合物のイオン化に適している。

＊2 ：スキャンモードは電場を低質量側から高質量側の範囲を何度も繰り返し走査（スキャン）していろいろなイオンを取り込む方法。主に分析対象とする化合物がどのような分子(またはフラグメント）イオンを生じるか予想できない時に使用する。

＊3 ：SIM モードとは Selected Ion Monitoring モードのことであり、電場を固定して特定質量のイオンのみを選択的に取り込む方法。メソッドで指定されたイオンのみを集中してモニターする分、スキャンモードよりも検出感度が向上する。

エ　考　察

8種類のマイコトキシンについて明瞭な MS スペクトルが得られ、モニターイオンを用いて同時分析が可能であることが明らかになった。しかし、デオキシニバレノール、ニバレノールなどのトリコテセン系マイコトキシンについては十分な感度が得られなかった。Agilent 製の LC-MS 装置では APPI インターフェースを用いてデオキシニバレノール、ニバレノール T-2トキシンなどのマイコトキシンの定量分析を行った例が報告されている（小野ら2003、石橋・小野2004）。また、島津製作所製 LC-MS 装置においても、APPI インターフェースを用いてトリコテセン系マイコトキシンとゼアラレノンの同時分析を行った例が報告されている（小西・田中2005）。したがって、今後条件検討をすることによって今回分析した8種類のマイコトキシンとトリコテセン系マイコトキシンの同時分析をすることは可能であると考えている。

オ　今後の課題

8種類のマイコトキシンを同時分析する条件を見いだしたが、今後はトリコテセン系マイコトキシンなどを含めたさらに多くの種類のマイコトキシンの同時分析条件を探求する。また、今回同時分析を行う際に使用したマイコトキシン混合溶液の濃度は2 ppm であったが、イオン化条件の検討によりさらに低濃度での検出が可能になるはずである。さらに、これらの手法を実際に穀物などの農作物中に含まれるマイコトキシンの同時定量分析に使用するためには、分析対象とする全てのマイコトキシンをマトリックスから効率よく抽出・精製する方法を確立することが重要である。従って、今後は機器分析操作に至る前のサンプル抽出・精製法についても十分な検討を行う。

カ　要　約

高速液体クロマトグラフ質量分析装置（LC-MS）を用いたマイコトキシンの同時分析を行った。大気圧光イオン化（APPI）インターフェースを使用して各種マイコトキシンについてスキャンモードで分析を行ったところ、アフラトキシン4種（B1、B2、G1、G2）、ステリグマトシスチン、オクラトキシン A、ゼアラレノン、パツリンの8種類のマイコトキシンについて明瞭な MS スペクトルが得られた。MS スペクトルデータに基づいてモニターイオンを決定した。これらのマイコトキシンを2 ppm 濃度含む混合溶液を調製し、SIM モードで分析を行ったところ、いずれのマイコトキシンも検出され、同時分析が可能であることが明らかになった。

キ　引用文献

石橋隆幸・小野雄造 2004. 高速液体クロマトグラフ質量分析計による飼料中の T-2トキシンの定量. 飼料研究報告. 29: 1-10.

小野雄造・水野和俊・石黒瑛一 2003. 高速液体クロマトグラフ質量分析計による飼料中のデオキシニバレノール及びニバレノールの同時定量. 飼料研究報告. 28: 20-29.

小西良子・田中宏輝 2005. LC/MS を利用したカビ毒の分析. ファルマシア. 41:1081-1086.

研究担当者（中川博之*、長嶋等）

9　アフラトキシン生産防御法の開発

ア　研究目的

アフラトキシン(AF)は、*Aspergillus parasiticus* 及び *Aspergillus flavus* に属する一部のカビが生産する、極めて強力な発がん性及び急性毒性を有するかび毒である(Massey et al. 1995)。アフラトキシン生産カビは主として熱帯・亜熱帯地域の土壌に常在するが、穀物は世界中を貿易されるため穀物のアフラトキシン汚染は世界的に深刻な問題である。穀物の多くを輸入に頼るわが国でもアフラトキシンの問題は極めて重要な問題であるが、現在までのところ効果的なアフラトキシン汚染防御法は得られていない。一方、ステリグマトシスチンはアフラトキシン生合成の中間体であり、20種以上の多種のカビがステリグマトシスチンを生産し、日本においても汚染が報告されている。ステリグマトシスチン生合成経路はアフラトキシン生合成経路と共通であるため、その点からもアフラトキシン汚染の問題は日本においても重要である(Jelinek et al. 1989)。そこで、本研究では、微生物の宝庫である自然界から、アフラトキシン生産阻害活性を有する菌を単離し、新たなアフラトキシン生産阻害物質の発見を目指した。

イ　研究方法

(ｱ) 自然界からのアフラトキシン生産阻害菌の検出法

a　Visual agar plate assay の利用

ノルゾロリン酸はアフラトキシン生合成経路の最初の色素性中間体であり、ノルゾロリン酸蓄積変異株の菌糸は鮮やかな赤色を示す。本研究ではノルゾロリン酸蓄積変異株 *Aspergillus parasiticus*NIAH-95を作出し、Hua らの方法(1999)をもとにNIAH-95と種々の微生物を対峙培養し、微生物による NIAH-95菌糸の赤色の減少を指標にアフラトキシン生産阻害微生物を選抜した(図2409-1)。

b　マイクロタイタープレートアッセイ法の確立

阻害活性の微量検出法として、96穴マイクロタイタープレートを用いた。各穴に寒天培地（0.1 ml）を入れ、10μリットルの阻害物質抽出液を滴下する。その後NIAH-95の胞子を接種し、培養した。NIAH-95菌糸の赤色の減少を調べることで鋭敏な阻害活性微量の検出法が確立できた(Yan et al. 2004)(図2409-2)。

c　チップ培養法

ピペットマンの1 mlチップを培養器として、阻害物質を添加した液体培地（250μリットル）に、アフラトキシン生産カビ *Aspergillus parasiticus* NRRL2999の胞子液を接種した。28℃、4日間培養後、培養液中のアフラトキシン量と菌体重量とを測定した(Yabe et al. 1988)(図2409-5)。

(ｲ) 阻害微生物の同定

アフラトキシン生産阻害菌について、形態やグラム染色、カタラーゼ・オキシダーゼ酵素活性等、種々の性状を検討した。16S リボゾーム RNA の遺伝子配列を PCR で増幅し配列を決定後、ホモロジー検索を行った。

(ｳ) 培養条件及び阻害物質の性質検討

アフラトキシン生産阻害活菌を種々の温度や培養条件で培養し、阻害物質の生産活性を比較した。また、阻害物質の熱安定性および pH 安定性を調べた。

(ｴ) 阻害物質の大量生産と精製

阻害微生物を18リットルのGY(2% glucose, 0.5% yeast extract)液体培地に接種し、培養後培養液を、Diaion HP20カラムクロマトグラフィー、シリカゲル薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等を用いて精製した。

(ｵ) 阻害物質の構造決定と性質検討

^{1}H-NMR、^{13}C-NMR、質量分析を行い構造決定した。立体異性体を合成し、異性体間の阻害活性の比較をマイクロタイタープレートアッセイ法を用いて検討した(図2409-4)。

(ｶ) 阻害物質の阻害機構

チップ培養法を用いて、阻害物質のアフラトキシン生産への影響と菌体重量への影響を調べた。また、阻害物質によるアフラトキシン関連遺伝子3種(Yabe・Nakajima 2004)の発現変化をRT-PCR法によって検討した。

ウ　研究結果

(ｱ) アフラトキシン生産阻害菌の単離と同定

土壌等の環境から微生物を採集し Visual agar plate assay を行った。隣接するノルゾロリン酸蓄積株の菌糸の赤色を消失させた菌を選抜し純化することによって、最終的に10種の阻害微生物が得られた。最も阻害活性の高い菌（A1と仮称）について、形態や生化学的性質、16S rRNA 遺伝子配列を調べて *Achromobacter xylosoxidans* である事が明らかになった(図2409-2)。微生物バンクから入手した同種の菌も同様に阻害活性を示した(Yan et al. 2004)。

(ｲ) アフラトキシン生産阻害物質の精製

18リットルの GY 液体培地で *Achromobacter xylosoxidans* A1を培養後、得られた培養液を Diaion HP20カラム(6x20 cm)に添加し、カラムに結合した物質を種々のメタノール濃度で溶出した。マイクロタイタープレートアッセイで調べると60-80%画分が最も高い阻害活性を示した。この画分をシリカゲル薄層クロマトグラフィーで二回精製し、さらに ODS 逆相カラム装備の高速液体クロマトグラフィーで精製した。クロマトグラムのピークについて阻害活性を調べると、一つのピークに一致して阻害活性が検出され、最終的に3.5 mg の精製阻害物質が得られた(Yan et al. 2004)。

(ｳ) 阻害物質の構造決定とその作用

阻害物質は質量分析から分子量が210ダルトンで、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR 及び旋光分散の結果から L-ロイシンと L-プロリンが環状に連結した cyclo(L-leucyl-L-prolyl)であることが明らかとなった(図2409-3)。

マイクロタイタープレートアッセイでノルゾロリン酸生産阻害活性の濃度依存性を調べたところ、cyclo(leucyl-prolyl)は1.0 mg ml^{-1}の濃度で50%の阻害を示した。cyclo(L-leucyl-L-prolyl)の立体異性体である L-D 体と D-L 体を合成し、D-D 体は購入して、各異性体の活性を比較すると、L-L 体が最も強い阻害活性を示した(図2409-4)。また、他の環状ジペプチド

cyclo(L-Pro-L-Val)及び cyclo(L-Leu-L-Gly)等は異なる阻害活性を示し、その結果から阻害には疎水性アミノ酸とプロリンの存在が必要であることが明らかとなった。

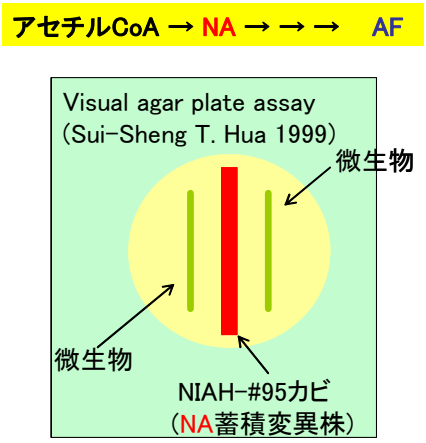


図2409-1　Visual agar plate assay Hua et al. (1999)の手法を参考

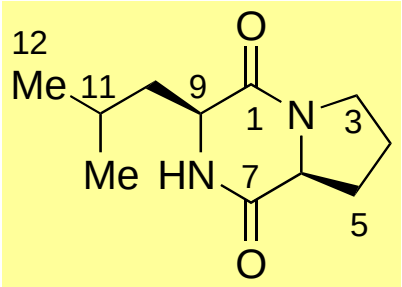


図2409-3　*Achromobacter xylosoxidans* が作る新規のアフラトキシン生産阻害剤 cyclo (L-Leucyl-L-Prolyl)

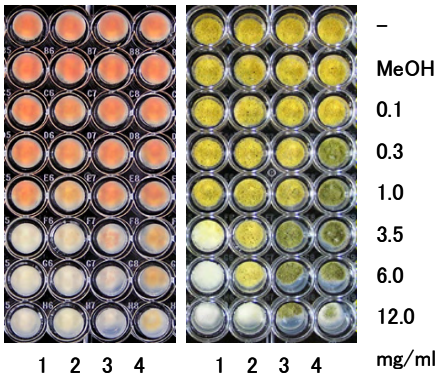


図2409-4　cyclo(L-Leucyl-L-Prolyl)と他の異性体によるカビのノルゾロリン酸生産阻害活性(左図)と生育阻害活性(右図)
(マイクロタイタープレートアッセイ)

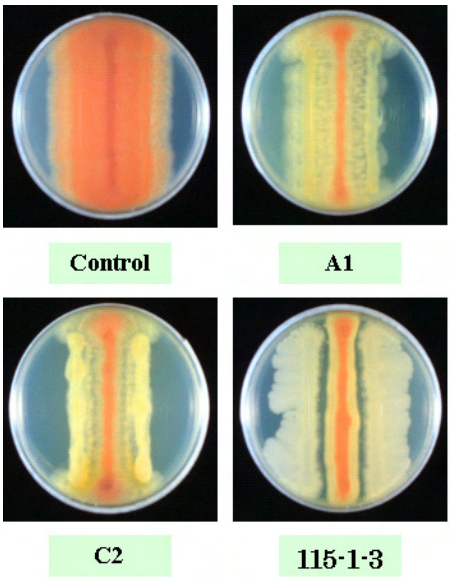


図2409-2　微生物によるノルゾロリン酸生産阻害
Control:微生物接種なし
A1, C2:ノルゾロリン酸生産阻害微生物
115-1-3:カビ生育阻害微生物
本研究では、A1について研究を進めた。

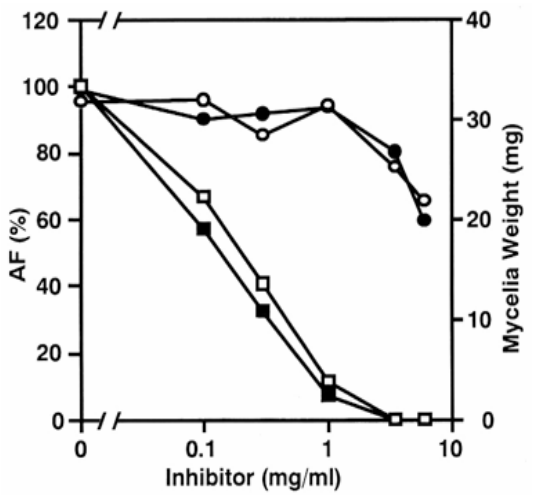


図2409-5　cyclo(L-Leucyl-L-Prolyl)によるアフラトキシン生産阻害
(チップ法の利用)
種々の濃度の cyclo(L-Leucyl-L-Prolyl)を培地に添加し、アフラトキシン生産菌を培養後、培地中のアフラトキシン量及びカビ菌体重量を測定した。

チップ培養法によってアフラトキシン生産への影響を調べたところ、cyclo(L-leucyl-L-prolyl は0.2 mg ml^{-1}の濃度でアフラトキシン生産を50%阻害した。一方、この濃度ではカビの生育は阻害されなかった。 6 mg ml^{-1}の濃度ではアフラトキシン生産は完全に阻害され、菌体重量もわずかに減少した(図2409-5)。以上、cyclo(L-Leu-L-Pro)は新規のアフラトキシン生産阻害物質であることが確認された(Yan et al. 2004)。

(エ) cyclo(L-leucyl-L-prolyl)の作用機作の検討

cyclo(L-Leu-L-Pro)はノルゾロリン酸の蓄積を阻害することから、阻害部位はノルゾロリン酸生産より前の段階にあると予想された。アフラトキシン生産関連遺伝子の発現に対する cyclo(L-Leu-L-Pro)の阻害効果を RT-PCR を用いて調べたところ、アフラトキシン酵素遺伝子 *pksL1*, *hexB*, *dmtA* とアフラトキシン制御遺伝子 *aflR* の発現は cyclo(L-Leu-L-Pro)により顕著に阻害された。したがって、阻害部位は *aflR* の発現より前にあると推定された(Yan et al. 2004)。

エ 考 察

(ア) ノルゾロリン酸蓄積株を用いたアフラトキシン生産阻害菌のスクリーニング法及び本研究で開発した微量検出法の有効性が確認された。これらの方法をさらに多くの微生物に応用することで、アフラトキシン阻害剤の候補として多種の物質が得られると期待される(矢部2006)。

(イ) 新規のアフラトキシン生産阻害物質cyclo(L-Leucyl-L-Prolyl)が得られた。阻害濃度が比較的高いため阻害剤として直接利用することは困難であるが、阻害活性を強めるため構造改変が可能である。

(ウ) 阻害効果が cyclo(L-Leu-L-Pro)の疎水性アミノ酸とプロリンの存在に依存していることから、細胞膜へ作用と阻害との関連が示唆された。またアフラトキシン制御遺伝子 *aflR* の発現を阻害することから、cyclo(L-Leucyl-L-Prolyl)の作用を詳細に研究することによって、アフラトキシン生産を効果的に抑制できる標的部位の解明につながると期待される。

(エ) 本研究で得られたアフラトキシン生産阻害菌のスクリーニング法及び阻害物質の微量検出法を用いることで、今後さらに自然界の種々の微生物からできるだけ多くの阻害阻害物質を単離できると考えられる。微生物を利用したアフラトキシン汚染防御法の開発へと研究をさらに発展させていくことが重要である(矢部2006)。

オ 今後の課題

(ア) 本研究で開発した手法をさらに多くの微生物に応用することによって、できるだけ多くのアフラトキシン生産阻害物質を単離し、アフラトキシン汚染防御につながる候補物質の選抜が必要である(矢部2006)。

(イ) 阻害物質の安全性や大量調製法の検討、また、実際に小規模散布実験などの検討も実用化へと展開するために必要である。

カ 要 約

(ア) アフラトキシン生産阻害物質を発見するために、ノルゾロリン酸蓄積変異株を利用した微量阻害活性検出法が有効であることが確認された。

(イ) 環境由来の *Achromobacter xylosoxidans* がアフラトキシン生産阻害活性を有することが明らかとなり、新規のアフラトキシン生産阻害物質cyclo(L-Leucyl-L-Prolyl)が得られた。

(ウ) cyclo(L-Leucyl-L-Prolyl)はアフラトキシン生産制御遺伝子 *aflR* の発現を阻害することによって作用することが確認された。

(エ) 本研究で開発した手法を用いてさらに多くの微生物から阻害物質を発見し、アフラトキシン汚染防御法の開発につなげることが重要である(矢部2006)。

キ 引用文献

Hua, S. S., et al. 1999. Interactions of saprophytic yeasts with a *nor* mutant of *Aspergillus flavus.* Appl Environ Microbiol 65:2738-40.

Jelinek, C. F., et al. 1989. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds--an update. J Assoc Off Anal Chem 72:223-30.

Massey, T. E., et al. 1995. Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B_1 carcinogenicity. Proc Soc Exp Biol Med 208:213-27.

Yabe, K., and H. Nakajima. 2004. Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. Appl Microbiol Biotechnol 64:745-55.

Yabe, K., et al. 1988. Isolation and characterization of *Aspergillus parasiticus* mutants with impaired aflatoxin

production by a novel tip culture method. Appl Environ Microbiol 54:2096-100.

Yan, P. S., et al. 2004. Cyclo(L-leucyl-L-prolyl) produced by *Achromobacter xylosoxidans* inhibits aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Appl Environ Microbiol 70:7466-73.

矢部希見子2006. 微生物を利用したアフラトキシンの制御技術. 食糧. 44:39-57.

研究担当者（矢部希見子）

10　ニバレノールによる造血系機能の低下機構の解明

ア　研究目的

以前より日本では、 *Fusarium* 属菌の汚染による麦類の赤かび病が知られていた。*Fusarium* 属菌はその植物病原性によって麦の収穫量を落とすだけでなく、かび毒（マイコトキシン）を産生して人や家畜に被害を与えてきた。現在の日本では赤かび病に重度に感染した麦が流通することはないが、過去には国内でも何度か *Fusarium* 属菌が原因と考えられる食中毒が発生している（Yoshizawa, 1983）。*Fusarium* 属菌の産生するかび毒にはトリコテセン骨格といわれる特徴的な構造を持つものが多く知られており、ニバレノールはその一種である（図2410-1）。

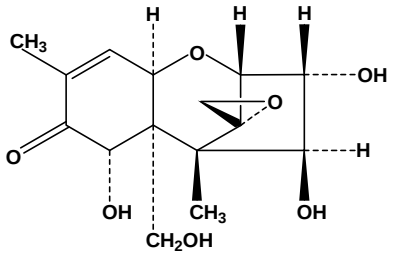


図2410-1　ニバレノールの化学構造

ニバレノールと類似の構造を持つデオキシニバレノールは、世界の多くの国で規制値が設定されている。日本においても、規制値が設定されている数少ない（3種）かび毒のうちの１つである。これは、食品の安全対策が進んでいる欧米ではデオキシニバレノール汚染が多く、ニバレノール汚染はほとんど観察されないという事情が背景にある。研究もその影響を受けており、デオキシニバレノールの研究論文数は、ニバレノールに比べて3倍以上あり、圧倒的に多い。

ところが日本では、欧米とは異なりニバレノールとデオキシニバレノールの汚染は同程度であることがわかっている（Sugiura et al., 1993, Yoshizawa and Jin, 1995）。しかもニバレノールは、デオキシニバレノールより急性毒性が強いとされている。このような状況を鑑みると、日本においてはデオキシニバレノールの研究に追いつくべくニバレノールの研究を充実させることが重要であると考えられる。

トリコテセン系かび毒の毒性として、消化器系の障害（嘔吐や下痢）や造血系の機能低下（白血球減少症）（Joffe, 1971）などが知られている。本研究ではニバレノールの毒性発現機構を解明する目的で、造血系機能に注目し、ニバレノールのヒト白血病細胞 HL60に対する細胞毒性の発現機構を解析した。

イ　研究方法

(ｱ) HL60細胞に対するニバレノールの細胞毒性

ニバレノールによる24時間処理後、種々の細胞毒性試験を行った。細胞毒性試験として、①細胞の形態変化の観察、②細胞増殖を調べる臭化デオキシウリジン（BrdU）取り込み実験、③ミトコンドリアの酵素活性を測定する WST-8アッセイ、④アポトーシス[*1]に伴って起こる DNA ラダー[*2]の検出、⑤細胞膜破壊に伴って培養液中に逸脱する乳酸脱水素酵素（LDH）活性の測定、を行った。

(ｲ) 細胞毒性に対する阻害剤の効果

トリコテセン系かび毒の毒性発現に細胞内カルシウムイオンが関与するという報告があるため（Yoshino et al., 1996）、細胞内のカルシウムイオンをキレートする1,2-bis(2-aminophenoxy) ethane-N, N, N’, N’-tetraacetic acid tetraacetoxymethyl ester (BAPTA-AM) の影響を調べた。細胞毒性試験の中で細胞増殖試験が最も感度が高かったので、HL60細胞を薬剤で24時間処理した後、BrdU の取り込み（細胞増殖能）を測定した。

(ｳ) ニバレノールによるサイトカイン[*3]分泌の誘導

ニバレノールによって分泌が亢進したサイトカインが、毒性発現に関与している可能性を検討した。炎症性サイトカインであるインターロイキン(IL)-8は、種々の病理現象の発生に重要な役割を果たすこと知られている。そこでニバレノールが IL-8の分泌を誘導するかどうかを調べた。HL60細胞をニバレノールで24時間処理した後、培養液中の IL-8量を測定した。

ウ　研究結果

(ア) HL60細胞に対するニバレノールの細胞毒性

①HL60細胞の形態は、1 μg/ml (3.2 μM)では表面が滑らかな丸い細胞が大部分で、無処理とあまり違いはなかった。しかし3 μg/ml 以上では細胞のダメージは明らかであり、半分以上の細胞が死んでいた (写真2410-1)。細胞の形態から判断すると、50%細胞毒性 (CC_{50}) [*4]は1 μg/ml と3 μg/ml の間にあると考えられた。②, ③50%阻害濃度 (IC_{50}) [*5]は、細胞増殖では0.16 μg/ml (0.51 μM)、WST-8アッセイでは0.40 μg/ml (1.28 μM)であった (表2410-1)。④DNA ラダーが3 μg/ml 以上では観察され、ニバレノールがアポトーシスを誘導することが示唆された。⑤細胞から漏出した LDH 活性は、実験に用いた最高濃度の10 μg/ml においても、すべての細胞が破砕された場合の活性の50% (CC_{50}) に達しなかった (表2410-1)。このように、何を指標として細胞毒性を測るかによって、毒性の評価は大きく異なった。

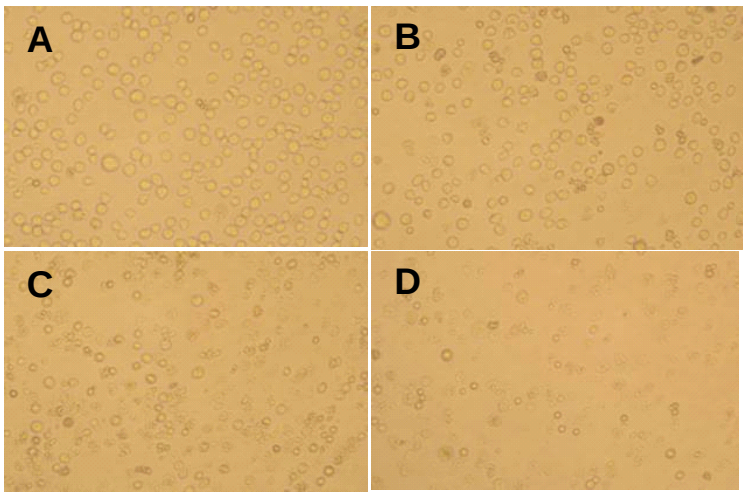


写真2410-1　ニバレノールによる　HL60細胞の形態変化

A) 対照 (0 μg/ml)　B) 1 μg/ml

C) 3 μg/ml　D) 10 μg/ml ニバレノールで24時間処理

表 2410-1　ニバレノールの HL60 細胞に対する細胞毒性

	BrdU (IC_{50})	WST-8 (IC_{50})	LDH (CC_{50}) (μg/ml)
ニバレノール	0.16 ± 0.03	0.40 ± 0.03	＞10

(イ) 細胞毒性に対する阻害剤の効果

BAPTA-AM は、単独処理で HL60細胞に対して弱い増殖阻害活性を示した (表2410-1)。一方、ニバレノールと BAPTA-AM で同時に処理すると、ニバレノールで単独処理した場合より BrdU の取り込みが多かった ($p < 0.05$) (表2410-2)。このことから、ニバレノールの HL60細胞に対する毒性に細胞内カルシウムイオンが関与すると考えられた。しかし、他のカルシウムモジュレーター[*6]であるベラパミルや EGTA では、ニバレノールの毒性に対する明確な影響は観察されなかった。

表2410-2　ニバレノールの細胞増殖阻害に対する BAPTA-AM の影響

	ニバレノール (0.3 μg/ml)	
	−	＋
なし	100 ± 20.6	10.3 ± 4.1[a]
BAPTA-AM (0.5 μM)	78.5 ± 21.3	17.1 ± 3.0[a]

[a] $p < 0.05$

無処理の細胞増殖能を100とした。

(ウ) ニバレノールによるサイトカインの分泌誘導

0.1 μg/ml ニバレノールではHL60細胞からの分泌量がわずかに減少したが、0.3 μg/ml 以上の濃度では分泌量は増加した（表2410-3）。3 μg/ml と10 μg/ml では、1 μg/ml ニバレノールよりむしろIL-8の分泌量は少なかった。

表2410-3　ニバレノールによるIL-8分泌誘導

ニバレノール	IL-8 (pg/ml)
0 μg/ml	33.2 ± 6.1
0.1 μg/ml	22.0 ± 5.0*
0.3 μg/ml	61.2 ± 4.4*
1 μg/ml	314.1 ± 12.9*
3 μg/ml	130.1 ± 18.5*
10 μg/ml	42.1 ± 2.7

* $p < 0.05$

*1：アポトーシスとは、生理的な細胞死であり、細胞体や核の収縮、断片化といった特徴的な変化を起こす。
*2：DNA ラダーとは、アポトーシスを起こした細胞の染色体 DNA に特徴的に見られる電気泳動パターンのことである。
*3：サイトカインとは、細胞から分泌されるタンパク質性の生理活性因子である。50種類以上あることが知られている。
*4：50%細胞毒性（CC_{50}）とは、観察・測定している方法によって50%の細胞が死んでいると判断される濃度のことである。
*5：50%阻害濃度（IC_{50}）とは、測定している活性が対照に比べて50%になる濃度のことである。
*6：カルシウムモジュレーターとは、カルシウムイオンの濃度を変化させたりすることで、細胞内カルシウムイオンの生理活性を調節する薬剤のことである。

エ　考　察

(ア) HL60細胞に対するニバレノールの細胞毒性

DNA ラダーが観察された濃度と細胞形態の変化した濃度（写真2410-1）が一致（3 μg/ml）することから、細胞の形態変化はアポトーシスによるためと考えられた。このことは、ニバレノールがアポトーシスを誘導することを示唆する報告と矛盾しない（Ueno et al., 1995）。細胞から漏出したLDH活性は、著しい形態変化が観察された10 μg/ml においても CC_{50}に達しなかった（表2410-1）。この結果は、10 μg/ml ニバレノール処理によって細胞はダメージを受けるが、細胞膜は破壊されないためと考えられた。この一見相容れないような現象も、細胞膜を破壊しない細胞死であるアポトーシスが起こっていると考えれば、矛盾しない。

(イ) 細胞毒性に対する阻害剤の効果

ニバレノールとBAPTA-AMの同時処理の実験から、ニバレノールの HL60細胞に対する毒性に細胞内カルシウムイオンが関与すると考えられた。これに対し、カルシウムチャネルの阻害剤であるベラパミルや細胞外カルシウムイオンのキレート剤であるEGTAは、ニバレノールの毒性を阻害しなかった。このことは、ニバレノールの毒性発現には、細胞外からのカルシウムイオンの流入ではなく、細胞内小器官からのカルシウムイオンの放出による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が関与するためと考えられた。

(ウ) ニバレノールによるサイトカインの分泌誘導

3 μg/ml と10 μg/ml ニバレノール処理では、1 μg/ml よりIL-8の分泌量が少なかった（表 2410-3）。この現象は、おそらくニバレノールによって細胞がダメージを受けたためと考えられる。ニバレノールによるIL-8分泌の亢進は、HL60細胞と性質が似ている U-937細胞でも観察されている（Sugita-Konishi and Pestka, 2001）。

オ　今後の課題

(ア) 本研究では、ニバレノールによって培養細胞に引き起こされる現象を主に生化学的手法によって解析してきた。しかし毒性の研究は細胞毒性の解析だけでは十分とは言えないので、今後状況を調えて動物個体を用いた研究も行うべきである。

カ　要　約

(ア) ニバレノールによる24時間処理後、細胞毒性試験を行った。①細胞は3 μg/ml 以上では半分以上の細胞が死んだ。細胞の形態から判断すると、50%細

胞毒性（CC_{50}）は1 μg/ml と3 μg/ml の間にあると考えられた。②細胞増殖を調べる臭化デオキシウリジン取り込み実験では、IC_{50}は0.16 μg/ml であった。③ミトコンドリアの酵素活性を測定する WST-8アッセイでは、IC_{50}は0.40 μg/ml であった。④アポトーシスに伴って起こる DNA ラダーは3 μg/ml 以上で観察され、ニバレノールがアポトーシスを誘導することが示唆された。ニバレノールによる細胞の形態変化はアポトーシスによるためと考えられた。⑤細胞膜破壊に伴って培養液中に逸脱する乳酸脱水素酵素は、10 μg/ml においても CC_{50}に達しなかった。この結果は、ニバレノール処理によって細胞はダメージを受けるが、細胞膜は破壊されないためと考えられた。このように、何を指標とするかによって、毒性の評価は大きく異なった。

（ｲ）ニバレノールの毒性発現への細胞内カルシウムイオンの関与を調べるために、細胞内カルシウムイオンのキレート剤1,2-bis(2-aminophenoxy) ethane - N, N, N’, N’-tetraacetic acid tetraacetoxymethyl ester（BAPTA-AM）の影響を調べた。細胞を薬剤で24時間処理後、細胞増殖能を測定した。ニバレノールと BAPTA-AM で同時に処理すると、ニバレノールで単独処理した場合より細胞増殖能が高くなった。このことから、ニバレノールの細胞に対する毒性に細胞内カルシウムイオンが関与すると考えられた。

（ｳ）ニバレノールが炎症性サイトカインのインターロイキン(IL)-8分泌を誘導するかどうかを調べた。細胞をニバレノールで24時間処理後培養液中の IL-8量を測定したところ、0.3 μg/ml 以上の濃度で IL-8量が増加した。

キ　引用文献

Joffe, A. Z. 1971. Alimentary Toxic Aleukia. Eds. Kadis, S. et al., Microbial Toxins VII. Academic Press, Inc., New York, USA. 139-189.

Sugita-Konishi, Y. and Pestka, J. J. 2001. Differential upregulation of TNF-α, IL-6, and IL-8 production by deoxynivalenol (vomitoxin) and other 8-ketotrichothecenes in a human macrophage model. J. Toxicol. Environ. Health A. 64:619-636.

Sugiura, Y. et al. 1993. *Fusarium poae* and *Fusarium crookwellense*, fungi responsible for the natural occurrence of nivalenol in Hokkaido. Appl. Environ. Microbiol. 59:3334-3338.

Ueno, Y. et al. 1995. Induction of apoptosis by T-2 toxin and other natural toxins in HL-60 human promyelotic leukemia cells. Nat. Toxins. 3:129-137.

Yoshino, N. et al. 1996. Transient elevation of intracellular calcium ion levels as an early event in T-2 toxin-induced apoptosis in human promyelotic cell line HL-60. Nat. Toxins. 4:234-241.

Yoshizawa, T. 1983. Ed. Ueno, Y, Trichothecenes-Chemical, Biological and Toxicological Aspects. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands. 195-209.

Yoshizawa, T. and Jin, Y. Z. 1995. Natural occurrence of acetylated derivatives of deoxynivalenol and nivalenol in wheat and barley in Japan. Food Addit. Contam., 12:689-694.

担当研究者（長嶋　等*、中川博之）

11　豚のモデル系を用いたデオキシニバレノールが免疫系に与える影響の解析

ア　研究目的

デオキシニバレノール（DON）はトリコテセン系マイコトキシンの一種で、DON による穀類汚染の拡がりが問題となっている。その毒性作用の一つとして、*in vitro* でヒト白血病由来の HL-60などの細胞株やヒト末梢血リンパ球にアポトーシスを誘導することが明らかにされており(Sun ら 2002、Ueno ら 1995)、免疫系への影響が懸念される。DON に対する感受性は家畜や実験動物の中では豚が最も高いため (Pestka ら 2005)、複雑な制御システムが存在する生体で免疫系への影響を評価するには、豚を用いた解析がヒトに対する影響を考える上で有用である。本研究では、豚の系をモデルとして DON 投与が生体に与える影響をリンパ組織を中心に病理組織学的・免疫組織化学的に検討した。

イ　研究方法

1カ月齢の豚6頭に DON を1 mg/kg 静脈内投与し、3頭には生食を投与して対照群とした。6時間後に投与群3頭、24時間後に投与群3頭と対照群3頭を解剖し、病理学的検査に供した。また、TUNEL 法および抗 single-stranded DNA・抗 cleaved caspase-3抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。

ウ　研究結果

DON 投与群では唾液分泌亢進・嘔吐・下痢などの

症状が見られ、剖検では共通して胃底から幽門部に出血を認めた。組織学的には、胸腺や回腸パイエル板などのリンパ組織で重度にリンパ球のアポトーシスがみられた（写真2411-1）。この変化は投与24時間後の豚で顕著であった。肝臓ではクッパー細胞の活性化や類洞内に脱落肝細胞・アポトーシス小体を認めた。胃では胃底から幽門部の粘膜で出血・壊死が認められた（写真2411-2）。

リンパ組織および肝臓で形態学的にアポトーシスを呈した細胞は、TUNEL 法および抗 single-stranded DNA・抗 cleaved caspase-3免疫組織化学染色で陽性を示した（写真2411-3）。

1)　2)　3)

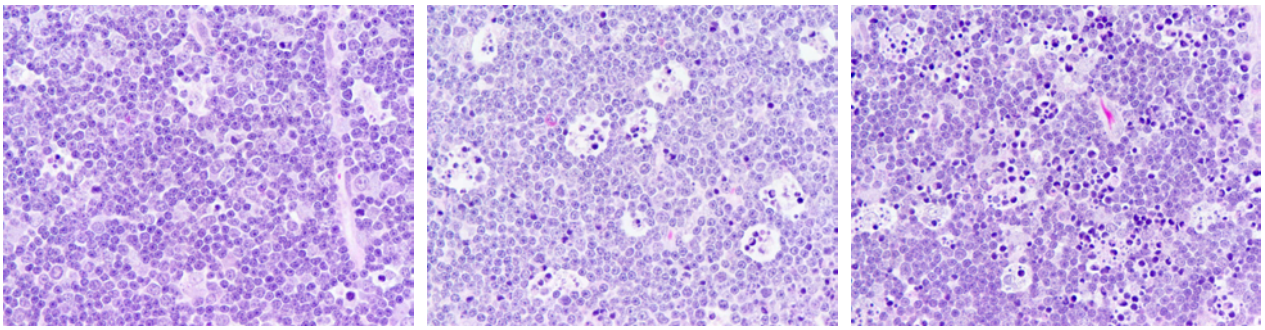


写真2411-1　DON 投与による胸腺の変化
1) 対照豚
2) DON 投与後 6 時間
3) DON 投与後24時間

1)　2)　3)

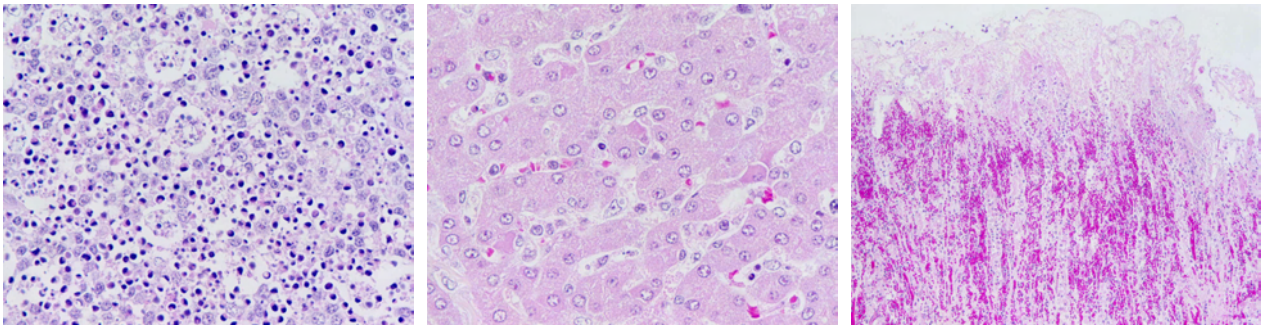


写真2411-2　DON 投与による回腸パイエル板・肝臓・胃の変化
1) 回腸パイエル板、DON 投与後24時間
2) 肝臓、DON 投与後 6 時間
3) 胃、DON 投与後24時間

1)　2)　3)

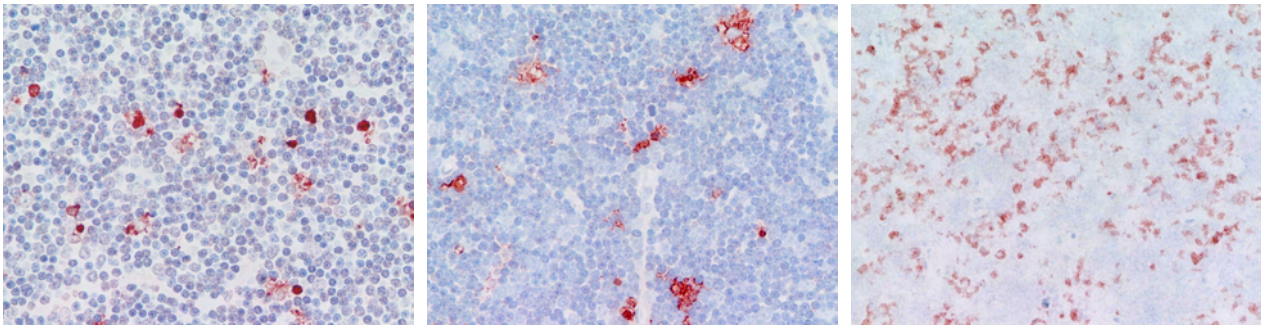


写真2411-3　DON 投与豚の胸腺の TUNEL 法および免疫組織化学染色
1) TUNEL 法、DON 投与後24時間
2) 抗 single-stranded DNA 免疫組織化学染色、DON 投与後24時間
3) 抗 cleaved caspase-3免疫組織化学染色、DON 投与後24時間

エ　考　察

豚へのDONの高濃度静脈内投与により、胸腺をはじめ全身のリンパ組織で重度のリンパ球のアポトーシスが誘導されることが、*in vivo* で証明された。このことから、DONは高濃度暴露時に免疫抑制性に働くことが考えられる。一方で、マウスに対するDONの低濃度暴露では免疫刺激性に働いたとする報告もあり、DONの免疫系に対する作用は暴露濃度やその期間によっても異なるようである(Pestkaら 2004)。

リンパ組織以外の変化として、肝臓で肝細胞のアポトーシスが認められた。*in vitro* でDONが初代培養肝細胞にアポトーシスを誘導することは報告されているが（Mikamiら 2004)、*in vivo* における報告はこれが初めてである。胃でみられた胃底から幽門部粘膜の出血ないし壊死は、投与経路から考えると何らかのメディエーターを介した間接的な作用であるように思われる。

TUNEL法および抗single-stranded DNA抗体を用いた免疫組織化学染色は、アポトーシスの際に切断されるDNAの断片を検出する手法である。また、caspase-3はアポトーシスの実行段階で活性化される酵素の一つで、今回免疫組織化学染色で使用した抗体は，活性型のcaspase-3を検出することができるため特異性が高い。リンパ組織や肝臓で形態学的にアポトーシスを呈した細胞は、TUNEL法、抗single-stranded DNAおよび抗cleaved caspase-3免疫組織化学染色で陽性を示したことから、アポトーシスであることが確認された。また、DONと同じトリコテセン系のマイコトキシンであるフザレノンXは、caspase-9およびcaspase-3の活性化を介したHL-60細胞のアポトーシスを誘導することが報告されているが（Miuraら 2002）、DONにより誘導されるアポトーシスもcaspase-3の活性化を介するものであることが示唆された。

オ　今後の課題

今回は免疫系に対する直接的な影響を明らかにするため、DONの高濃度静脈内投与という方法により検討を行ったが、低濃度暴露時に免疫系に与える影響や、複合汚染時の複数のマイコトキシンによる相互作用についても今後検討が必要である。

カ　要　約

豚にDONを高濃度静脈内投与することにより、リンパ組織で顕著なリンパ球のアポトーシスを誘導すること、肝細胞にもアポトーシスがみられること、胃底から幽門部粘膜に出血・壊死をおこすことが明らかとなった。形態学的にアポトーシスを呈した細胞は、TUNEL法、抗single-stranded DNAおよび抗cleaved caspase-3免疫組織化学染色で陽性を示し、caspase-3の活性化を介したアポトーシスであることが示された。

キ　引用文献

Mikami, O., Yamamoto, S., Yamanaka, N., Nakajima, Y., 2004. Porcine hepatocyte apoptosis and reduction of albumin secretion induced by deoxynivalenol. Toxicology 204：241-249.

Miura, K., Aminova, L., Murayama, Y., 2002. Fusarenon-X induced apoptosis in HL-60 cells depends on caspase activation and cytochrome *c* release. Toxicology 172：103-112.

Pestka, J. J., Zhou, H. R., Moon, Y., Chung, Y. J., 2004. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes：unraveling a paradox. Toxicol. Lett. 153：61-73.

Pestka, J. J., Smolinski, A. T., 2005. Deoxynivalenol：toxicology and potential effects on humans. J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev. 8：39-69.

Sun, X. M., Zhang, X. H., Wang, H. Y., Cao, W. J., Yan, X., Zuo, L. F., Wang, J. L., Wang, F. R., 2002. Effects of sterigmatocystin, deoxynivalenol and aflatoxin G_1 on apoptosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. Biomed. Environ. Sci. 15：145-152.

Ueno, Y., Umemori, K., Niimi, E., Tanuma, S., Nagata, S., Sugamata, M., Ihara, T., Sekijima, M., Kawai, K., Ueno, I., Tashiro, F., 1995. Induction of apoptosis by T-2 toxin and other natural toxins in HL-60 human promyelotic leukemia cells. Nat. Toxins 3：129-137.

研究担当者（三上　修*、村田英雄、中島靖之）

第5章　栽培技術等による赤かび病かび毒のリスク低減技術の開発

1　ムギ類赤かび病関連フザリウム属菌の分子系統学的解析と同定用プライマーの開発

ア　研究目的

遺伝子DNAの塩基配列に基づく分子系統学的手法の導入により、ムギ類赤かび病関連菌種を含めたフザリウム属菌の分類学的変革は近年めざましい。課題担当者は現在までに日本産のフザリウム属菌について分類学的研究を進め、約40種の本属菌の存在を再確認してきたが、これらは個々の菌株単位に基づく個別記載型の研究であった。日本におけるムギ類赤かび病関連菌種に関する研究では、分類学的難しさも原因となり、本病に関わる種構成さえ完全には捉えられていない現状にある。本研究では、日本におけるムギ類赤かび病に関連する分離菌株を材料にして多遺伝子領域のDNA塩基配列を決定し、それに基づいた血統学的解析を行うことで、日本産菌種・菌株の分子系統学的位置づけや種内変異を明らかにする。また、日本産菌種のDNA塩基配列情報を菌種の参照菌株と比較することで、日本産ムギ類赤かび病関連菌種を迅速に分類・同定するための種特異PCRプライマーの開発を目的とする。

イ　研究方法

(ｱ)（独）農業生物資源研究所NIASジーンバンク（MAFF）所蔵等の日本産のムギ類の赤かび病関連フザリウム属菌14種32菌株について、ミトコンドリア小サブユニットrDNA、核rDNA ITS領域、18SrDNA（部分）、5SrDNA、28SrDNA（部分、D1D2ドメインを含む）、ヒストン遺伝子領域について PCR 法にてDNA を増幅後、塩基配列を決定した。また、他の日本産2種3菌株を比較のため同様に解析した。

(ｲ) 複数の遺伝子領域に関して得られたDNA塩基配列を分子系統学的に解析し、日本産の菌種・菌株の分子系統学的位置を日本産の種間および種内菌株間で比較検討し、構築予定の分類用DNA塩基配列情報のデータ・セットの一部とした。

(ｳ) 米国USDA/ARSのNational Center for Agricultural Utilization Research （NRRL）に所蔵されるムギ類赤かび病主原因菌種 *Fusarium graminearum*（広義）に含まれる9つの種内系統群（系統学的種）を植物防疫法の許可の下で輸入し、MAFFに登録した。

(ｴ) MAFF 所蔵及び課題担当者が収集した日本産 *F. graminearum*（広義）75菌株についてヒストン遺伝子領域等の塩基配列を決定、分子系統学的位置づけを解析した。また、近縁の日本産2菌種、*F. cerealis* と *F. culmorum* の4菌株を比較のため同様に解析した。得られた塩基配列情報は構築中の分類用DNA塩基配列情報のデータ・セットに加えた。

(ｵ) 米国NRRLに所蔵される *F. graminearum* 種複合体9種の標準菌株と日本産菌株から得られたヒストンH3遺伝子領域に見られる種特異的塩基配列を元に、*F. graminearum* 種複合体のうち、日本国内で分離される *F. graminearum*（狭義）と *F. asiaticum*、さらに形態学的に過去に混同された *F. cerealis* を識別するために種特異的PCRプライマーの設計を行った。

(ｶ) *Fusarium graminearum*（狭義）と *F. asiaticum* についてはさらにreductase、MAT遺伝子領域に認められる種特異的塩基配列を元に種特異的PCRプライマーの設計を行った。

(ｷ) MAFF 所蔵の *Fusarium avenaceum* 菌株についてヒストンの H3領域の DNA 塩基配列を決定し、分子系統学的位置づけを評価・解析した。

ウ　研究結果

(ｱ) 糸状菌類の分子系統解析に一般的に良く用いられるミトコンドリア小サブユニット rDNA、核rDNA ITS領域、18SrDNA（部分）、5SrDNA、28SrDNA（部分）の塩基配列（全1811サイト）に基づく分子系統学的解析（近隣結合法、ギャップ領域除去）により、日本産のムギ類赤かび病関連フザリウム属菌14種は異なった分子系統群としてほぼ分けることができた（図2501-1）。また、分子系統解析の簡便化を図るため、短いが系統シグナルの多いヒストンH3遺伝子領域（全453サイト）について分子系統解析（近隣結合法、ギャップ領域除去）を行ったところ、日本産のムギ類赤かび病関連フザリウム属菌14種の内、*F. graminearum*（広義）、*F. avenaceum* と *F. tricinctum* 以外の菌種は独立した系統群に分かれたが、*F. graminearum*（広義）と *F. avenaceum* はそれぞれ2群に別れ、*F. tricinctum* は *F. avenaceum* の1群（3菌株）と同一の塩基配列であった（図2501-2）。

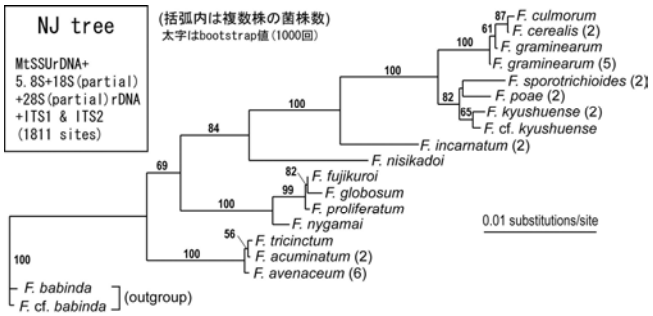


図2501-1　一般的遺伝子領域に基づく分子系統学的解析（近隣結合法、ギャップ領域除去）

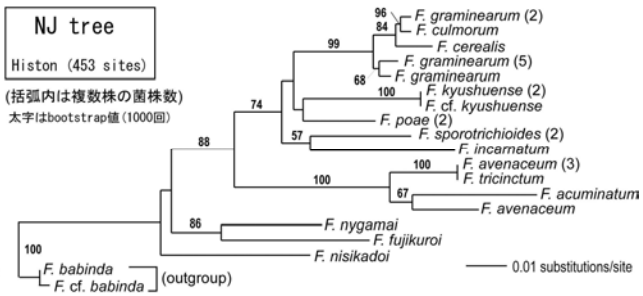


図2501-2　ヒストン遺伝子領域に基づく分子系統学的解析（近隣結合法、ギャップ領域除去）

(ｲ) O'Donnell ら（2004）は従来 *F. graminearum* 一種とされた菌種内に 9 つの分子系統群を見出し、それぞれ別種として分類学的に正式に記載発表した（8 新種を設立)。そこで、過去に *F. graminearum*（広義）として同定された日本産75菌株について、ヒストン H3領域の塩基配列（全424サイト）を決定したところ、*F. graminearum*（狭義）が18菌株（主に北海道産)、*F. asiaticum* が57菌株（北海道を除く、全国分布）が含まれた。ヒストン H3領域の塩基配列から日本産 *F. asiaticum* は大きく 2 つのハプロタイプに分かれた（図2501-3)。

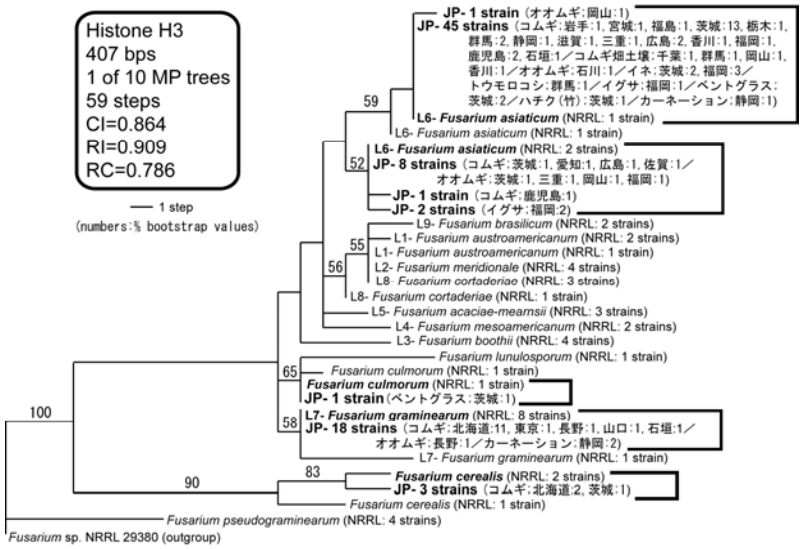


図2501-3　ヒストン H3領域に基づく F. graminearum 種複合体日本産菌株の分子系統解析（最大節約法）

(ｳ) 塩基配列を決定した遺伝子領域のアラインメントを詳細に比較検討したところ、多くの菌種で核 rDNA ITS-2領域、28SrDNA、ヒストン H3、reductase、MAT 遺伝子領域に菌種固有の DNA 塩基配列が認められ、特異プライマー設計の候補領域と判断された。

(ｴ) O'Donnell ら (2004) が公開した *F. graminearum* 種複合体 9 種の塩基配列データに加え、新たに明らかにした日本産 *F. graminearum* 種複合体の75菌株（*F. graminearum* と *F. asiaticum*）のデータに基づいてヒストンH3領域の種特異領域を精査し、*F. graminearum*（狭義)、*F. asiaticum*、*F. cerealis* に特異的な塩基配列を元に種の識別用 PCR プライマーの設計を行ったところ、それぞれの種ごとに 1，2 配列ずつ有望なプライマー候補を得た。それらプライマー候補につき検証試験と配列あるいは検出条件に改良を行い、ヒストン H3領域にもとづく *F. graminearum*（狭義)、*F. asiaticum*、*F. cerealis* 3 菌種用の種特異的 PCR プライマーを開発した（表2501-1;図2501-4)。*Fusarium graminearum*（狭義）と *F. asiaticum* については、reductase、MAT 遺伝子領域による種特異的 PCR プライマーも設計し、検証試験を行った（表2501-1;図2501-5)。

表2501－1　*Fusarium graminearum*, *F. asiaticum*, *F. cerealis* の同定用、種特異的 PCR プライマー

***Fusarium graminearum*（狭義）**				
Histone H3領域;	[F]GR05F:	TCGCATCATCSCTTGAT	+ [R]H3R1-18:	GACTGGATRGTAACACGC
reductase領域;	[F]GRred10:	GTATAAAAGAAATTCTGTTTA	+ [R]GRred20:	ATATAGATAAACTGTGTATC
MAT領域;	[F]GRmat13:	TTACTAGGCACCTATCTC	+ [R]GRmat22:	ACCGATGATGAGGAAGTG
Fusarium asiaticum				
Histone H3領域;	[F]AS1F15:	GCATCATCGCWTGGC	+ [R]H3R1-18:	GACTGGATRGTAACACGC
reductase領域;	[F]ASred10:	GTATAAAAGAAATTCTATTAG	+ [R]ASred20:	AATGCACAGTTTATCTATAT
MAT領域;	[F]ASmat13:	TTGCTAGGCACCTATCCT	+ [R]ASmat22:	ACCAATGATGAGGAAGTA
Fusarium cerealis				
Histone H3領域;	[F]CER02F15:	ACATCGTCGCTCGAC	+ [R]H3R1-18:	GACTGGATRGTAACACGC

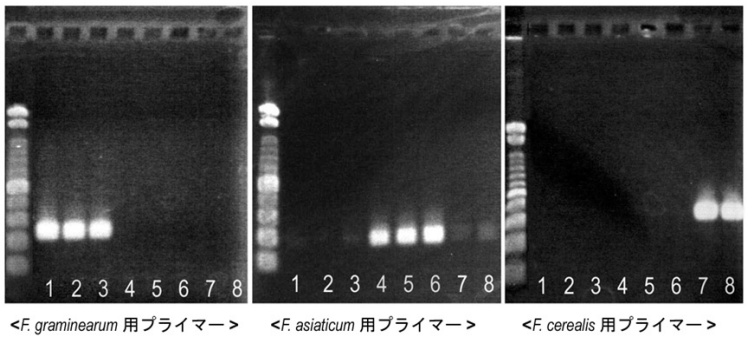


図2501-4　ヒストン H3領域における特異配列に基づく種特異的 PCR プライマーの検証結果（菌株;1-3: *F. graminearum*（狭義）; 4-6: *F. asiaticum*; 7,8: *F. cerealis*）

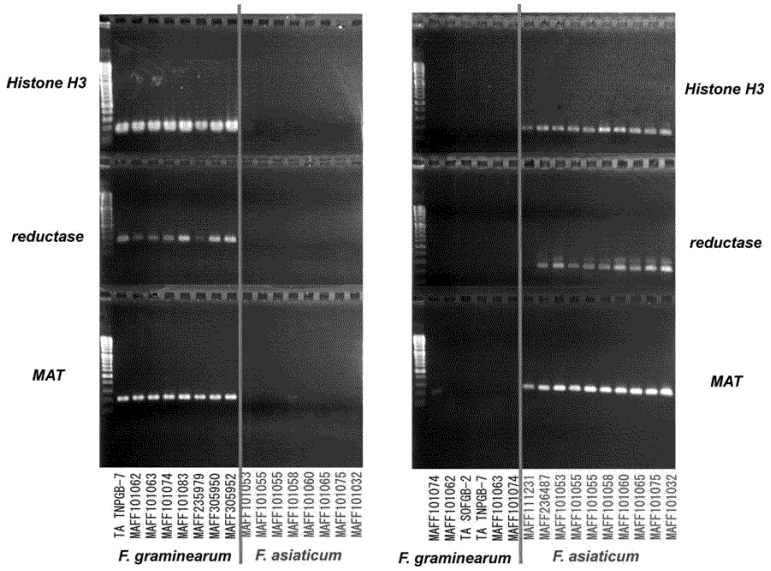


図2501-5　ヒストン H3（上）、reductase（中）, MAT（下）遺伝子領域における特異配列に基づいた種特異的 PCR プライマーの検証結果（左:*F. graminearum*（狭義） 8 菌株と *F. asiaticum* 8 菌株；右:*F. graminearum*（狭義） 6 菌株と *F. asiaticum*10菌株）

(オ) MAFF 所蔵の *Fusarium avenaceum* 全菌株についてヒストン H3領域の DNA 塩基配列を決定し、日本産の本種に最低 4 つの内部系統群が内在することが明らかにした。日本産ムギ類赤かび病関連菌種について、β-チューブリン遺伝子領域の DNA 塩基配列を決定した。

エ　考　察

(ア) 糸状菌の系統解析に一般的な遺伝子領域であるミトコンドリア小サブユニット rDNA、核 rDNA ITS 領域、18SrDNA（部分）、5SrDNA、28SrDNA（部分）、あるいはヒストン H3領域による分子系統学的解析で、日本産ムギ類赤かび病関連フザリウム属菌14種は異なる系統群として *F. tricinctum* と *F. avenaceum* が一群となる例外を除き、分類できた。

(イ) ヒストン H3領域は短いが分子系統シグナルが豊富で、作業面の能率、正確さの点で *F. graminearum*（狭義）と *F. asiaticum* の菌種鑑別に適した遺伝子領域である。

(ウ) 日本産 *F. graminearum* 種複合体をヒストン H3領域について系統解析したところ、日本では主に北方（北海道）に *F. graminearum*（狭義）が、中部から南方（主に本州以南の全国分布）に *F. asiaticum* が多く分布することが明らかとなった。

(エ) *Fusarium graminearum*（狭義）と *F. asiaticum* の同定のため、ヒストン H3領域、reductase 遺伝子領域、MAT 遺伝子領域について種特異的 PCR プライマーを設計し、配列、温度条件等の設定を行った。*F. graminearum*(狭義)、*F. asiaticum*、および *F. cerealis* の菌種鑑別には十分な数のプライマーセットが準備され、実用化段階であると判断される。

オ　今後の課題

Fusarium graminearum 種複合体については、種特異的プライマーの作成を含めて、菌種の同定法の開発と日本産の種構成について当初の目的を達成した。日本産 *F. avenaceum* にはヒストン H3領域の塩基配列から少なくとも 4 つの内部系統群の存在が明らかとなり、*F. tricinctum* との類縁性を含め分類学的な再考察が必要である。今後、他の遺伝子領域の解析を該当菌株について進め、日本産の本種の分布・出現状況について明らかにする。

カ　要　約

(ア) ムギ類赤かび病関連フザリウム属菌の日本産構成種について、ミトコンドリア小サブユニット rDNA 等の一般的遺伝子領域やヒストン H3領域をもとに分子系統解析した。

(イ) 日本産の *Fusarium graminearum* 種複合体菌種では、主に北方に *F. graminearum* が、中部から南方に *F. asiaticum* が多く分布する。

(ウ) *Fusarium graminearum*（狭義）と *F. asiaticum* の同定のため、ヒストン H3、reductase、MAT 遺伝子領域について種特異的 PCR プライマーを設計し、検証した。実用化段階である。

キ　引用文献

O'Donnell, K., Ward, T. J., Geiser, D. M., Kistler, H. C., and Aoki, T., 2004. Genealogical concordance between mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the Fusarium graminearum clade. Fungal Genet. Biol. 41: 600-623.

研究担当者（青木孝之）

2　赤かび病菌マイコトキシン不活性化・解毒遺伝子の穀類における発現と産生抑制技術の開発

ア　研究目的

コムギやオオムギなどの重要穀類に感染する赤かび病菌は、人畜に重篤な生理傷害をもたらす 2 つのかび毒（トリコテセンとゼアラレノン）を生産し、穀粒をこれらの毒素で汚染する。本研究課題では、分子生物学的、生化学的手法を駆使して、かび毒汚染を制御する技術を開発する上で必要な分子レベルでの基盤を構築することを目的とする。まず、かび毒を不活性化・解毒する遺伝子をモデル穀類に導入し、病徴や毒素蓄積量の低減化に寄与することができるかどうか調査する。また、トリコテセンの生合成メカニズムを解明すため、生合成遺伝子の取得と解析を行う。これら生合成遺伝子の機能や進化について新たな知見を得て、これらの知見を将来的に感染の防除や毒素産生防除剤の開発へと資する。さらに、赤かび病耐性に関わる可能性のあるコムギ遺伝子の同定を行い、それらの機能や発現を詳細に解析し、かび毒低減化のための遺伝子資源としての有用性を検証する。

イ　研究方法

(ア) かび毒を不活性化・解毒する遺伝子の穀類へ

の導入

トリコテセンやゼアラレノンの不活性化・解毒遺伝子を赤かび病菌が実際に感染することが分かっているイネに導入し、組換え技術によるマイコトキシン汚染抑制の可能性を評価する。イネへの遺伝子の導入はパーティクルガン法を用い、形質転換体の選抜にはブラストサイジンSを用いる（福田ら 2006）。得られた形質転換体は少なくともT2世代まで解析し、形質がホモ固定されたものを用いてかび毒蓄積や病原性について調査する。

(ｲ) トリコテセン生合成遺伝子の進化と機能解析

トリコテセン生合成に重要な役割を果たす未同定の経路遺伝子を単離して、その進化と機能を明らかにする。isotrichodermol から isotrichodermin への変換反応を担う生合成遺伝子 *Tri101*のホモログ *Tri201*は毒素非生産菌にも存在するが（木村ら 2003）、まずこの近傍に他の生合成遺伝子が存在するかどうかについてコスミドの単離と配列解析を行う。次に、既に単離されている生合成遺伝子のうちシトクロムP450モノオキシゲナーゼ（CYP）が生合成の複数ステップの進行に関与する可能性を、酵母を異種ホストとした発現系を用いて調査する。

(ｳ) 病害抵抗性に関わるコムギ遺伝子の解析

赤かび病菌を感染させたコムギの穎花で誘導発現するコムギの防御関連遺伝子として、キシラナーゼインヒビターに着目し、その機能、進化、発現について詳細に解析する。まず、既知の *Taxi-I* の配列（Fierens ら 2003）に基づいて他の *Taxi* ファミリーメンバーを単離し、それらの詳細な発現解析を行い、病原菌の感染時に特異的に発現するものを同定する。さらに他の *Taxi* ファミリーメンバーとの系統関係について調べるとともに、コードするタンパクを大腸菌で発現させ、キシラナーゼ阻害活性を示すかどうかについて調査する。

ウ　研究結果

(ｱ) かび毒を不活性化・解毒する遺伝子の穀類への導入

ゼアラレノン解毒遺伝子 *zhd101*を導入したイネにおいて、図2502-1に示すように水分活性が低く、酵素の働きにくい状態の種子の部分でもゼアラレノンの解毒が可能であることを実証した。また、トリコテセン不活性化遺伝子 *Tri101*を導入したイネに赤かび病菌を感染させたところ、病徴が軽減されることが示唆される結果を得た（図2502-2）。

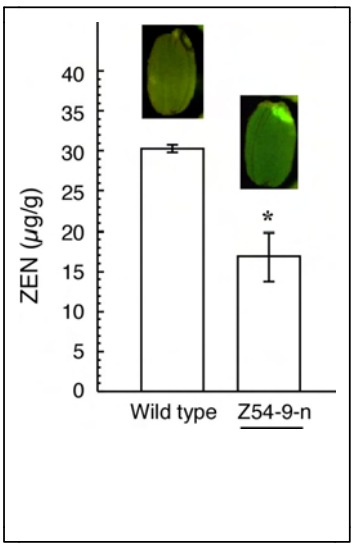


図2502-1　組換えイネによるゼアラレノン解毒
ゼアラレノン（ZEN）蓄積量を縦軸に
左：非組換え体の穀粒
右：組換え体の穀粒

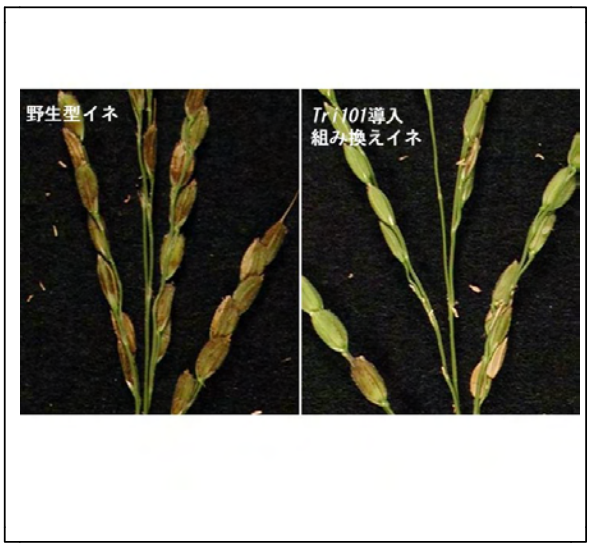


図2502-2　組換えイネ接種試験
赤かび病徴の写真
左：非組換え体の感染穂
右：組換え体の感染穂

(ｲ) トリコテセン生合成遺伝子の進化と機能解析

トリコテセン非生産菌 *Fusarium oxysporum* の *Tri101*ホモログである *Tri201*を含むコスミドをクローニングし、周辺の配列解析を行った。この領域は *Fusarium* 属菌の間でマイクロシンテニーを形成していたが、他の生合成遺伝子はこの領域には見いだせなかった（図2502-3)。また、生産菌のトリコテセン遺伝子クラスターの両端の領域は、*Fusarium* 属菌の間でシンテニーを形成していなかったためトリコテセン遺伝子クラスターの進化に関する情報は得られず、*F. oxysporum* から *Tri201*以外の生合成遺伝子を見いだすことは出来なかった。しかし、より遠縁のトリコテセン非生産性 *Fusarium* 属菌やその他の子嚢菌から *Tri101*の機能ホモログを見出すことができた。そこで次に既知の生合成遺伝子である *Tri1*が複数の機能を持つ可能性を検証するため、*Tri1*を酵母で発現させ、トリコテセンへの作用を調べた。その結果、*Tri1*は 2 カ所の位置に水酸基を導入することができる多機能 CYP であることが示された。

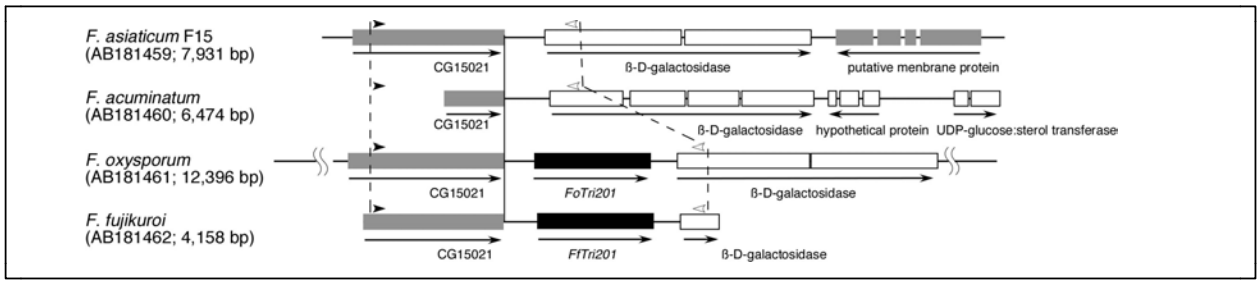


図2502-3 *Fusarium* 属菌の *Tri201* 遺伝子周辺のマイクロシンテニー

(ｳ) 病害抵抗性に関わるコムギ遺伝子の解析

サザン解析の結果、*Taxi*は大きな遺伝子ファミリーを形成していることが判明した。新規 *Taxi* ファミリー遺伝子として *Taxi-III* と *Taxi-IV* を単離した。開花期の穂において、*Taxi-I*は子房以外の組織では赤かび病菌の感染の有無に拘わらず全く発現していないのに対し、*Taxi-III* と *Taxi-IV* は赤かび病菌の感染に対応して外頴、内頴で強く誘導発現されることが明らかとなった。*Taxi-III* のコードするタンパクは、キシラナーゼの活性中心クレフトの奥深くまで入り込んでキシラナーゼ活性を阻害する役割を果たすループの部分において、非同義置換と同義置換の割合（*dN/dS*) が 1 を超しており適応進化してきたことが示唆された。すなわち、病原菌の病原性因子と宿主植物の防御因子が、それぞれインヒビターに認識されないように、キシラナーゼを認識できるように、と共進化してきたことを意味する。また、大腸菌で発現させた組換えタンパクは、ファミリー11キシラナーゼに対して選択的阻害活性を示すことが明らかとなった。一方、*XIP* タイプのキシラナーゼインヒビターは *Taxi* タイプほど大きな遺伝子ファミリーは形成していなかった。*Xip-I* は、*Taxi-I* とは異なって病原菌の感染に対して発現誘導され、また *Taxi-III* や *Taxi-IV* とも異なって種子形成の段階でも発現していた。

エ　考　察

(ｱ) かび毒を不活性化・解毒する遺伝子の穀類への導入

*zhd101*遺伝子のコードするゼアラレノン解毒酵素は、*in vitro* では分子活性が低くかつ至適 pH も高く、生体内で十分な効果が発揮できるかどうかについては明らかではなかった、しかし、組換えイネの穀粒で高濃度の毒素を分解できたことから、組換え体を用いた *in vivo* でのかび毒の解毒が可能であると考えられた。

(ｲ) トリコテセン生合成遺伝子の進化と機能解析

麹菌など食品産業に用いられる重要なカビを含む *Aspergillus* 属菌では、アフラトキシン生合成遺伝子の偽遺伝子クラスター（欠損したもの）を有することが知られている。すなわち、もともとはアフラトキシン生産菌だったものが変異してアフラトキシンを作らなくなったことを意味する。一方トリコテセンでは、近縁の非生産性 *Fusarium* 属菌は生合成遺伝子 *Tri201*を有するものの、偽遺伝子化したクラスターが見出されなかった。このことは、トリコテセンを生産する *Fusarium* 属菌は、その種の共通の祖先に

分化してから毒素生産能力を獲得し、保持してきたことを示唆する。すなわち、トリコテセン毒素を生産することが病原菌として適応する上で有利に働いたため選択圧が働き、毒素生産能を失わずに進化してきたことを意味する。また、多機能 CYP の存在が示されたことから、未同定の生合成遺伝子として既知の *Tri* 遺伝子の機能を再度調べる必要が示されたと言えよう。

(ｳ) 病害抵抗性に関わるコムギ遺伝子の解析

病原性糸状菌が宿主植物成分上で分泌するキシラナーゼに対応した防御タンパクとしてキシラナーゼインヒビターが同定され、病原菌感染による発現誘導やキシラナーゼ結合部位での共進化の存在が明らかになったことは、キシラナーゼが赤かび病菌の病原性因子として働くことを強く示唆すると言えよう。

オ　今後の課題

(ｱ) かび毒を不活性化・解毒する遺伝子の穀類への導入

*Tri101*遺伝子を導入したイネの赤かび耐病性実験に関しては、一度限りの結果であるので再現性を確認する必要がある。赤かび病菌を *Tri101*導入組換えイネへ接種した際の病徴評価を繰り返して行い、毒素不活性化によるイネの赤かび耐性を統計的に処理する。

(ｲ) トリコテセン生合成遺伝子の進化と機能解析

複数の機能をもつ CYP をコードする *Tri* 遺伝子について、酵母を用いた発現系でその機能を詳細に調べる。特に基質となる生合成中間体を調製するためには、標的破壊体の代謝産物を精製し、一通りそろえる必要があるので、準備にかなりの手間がかかる。これらの重要な酵素を標的として、毒素産生抑制剤を探索する。

(ｳ) 病害抵抗性に関わるコムギ遺伝子の解析

Taxi や *Xip* などのキシラナーゼインヒビターがキシラナーゼへ結合する強度やその特異性を広げることができれば、打破されにくい抵抗性を付与できる遺伝子資源として期待できる。このような性質を持つように遺伝子を改変し、またそれをコムギに導入することによって、その効果を検証する。

カ　要　約

(ｱ) かび毒を不活性化・解毒する遺伝子の穀類への導入

トリコテセンを不活性化する遺伝子およびゼアラレノンを解毒する遺伝子をモデル穀類のイネに導入し、それぞれ病徴の軽減および毒素の低減化に有用であることを示した。

(ｲ) トリコテセン生合成遺伝子の進化と機能解析

*Tri101*のホモログは毒素産生能の有無に拘わらず全ての *Fusarium* が有していた。また生産菌において、トリコテセン生合成遺伝子は獲得されてから毒素生産能を失うことなく進化してきた。既知の *Tri* 遺伝子が複数のステップ（CYP による水酸化）の進行に関与することが示された。これらの遺伝子がコードする酵素は、重要な毒素産生抑制剤のターゲットとなる。

(ｳ) 病害抵抗性に関わるコムギ遺伝子の解析

コムギの新規キシラナーゼインヒビターを見い出し、赤かび病菌の感染に対して防御応答に関与していることを明らかにした。

キ　引用文献

Fierens, Katleen・Brijis, Kristof・Courtin, Christophe M.・Gebruers, Kurt・Goesaert, Hans・Raedschelders, Gert・Robben, Johan・Van Campenhout, Steven・Volckaert, Guido・Delcour Jan A. 2003. Molecular identification of wheat endoxylanase inhibitor TAXI-I, member of a new class of plant proteins. *FEBS Letters*. 540：259-263.

福田徹子・安藤直子・大里修一・井川智子・門倉香・濱本宏・中迫雅由・工藤俊章・柴田武彦・山口勇・木村真　2006. A fluorescent antibiotic resistance marker for rapid production of transgenic rice plants. *Journal of Biotechnology* . 122：521-527.

木村真・東海武史・松本源太郎・藤村真・濱本宏・米山勝美・柴田武彦・山口勇　2003. Trichothecene non-producer Gibberella species have both functional and nonfunctional 3-O-acetyltransferase genes. Genetics. 163：677-684.

研究担当者（木村真*）

3　赤かび毒素の遺伝子定量法の開発

ア　研究目的

わが国に広く分布する麦類赤かび病菌 *Fusarium graminearum* は赤かび毒素（デオキシニバレノールおよびニバレノール）で麦類を汚染し、摂取した人に下痢、嘔吐など中毒を引き起こすことが知られてい

る。近年赤かび毒素の生合成に関与する遺伝子群が明らかになってきたので、PCR 検出法によって同定が難しい *Fusarium* 属の毒素産生菌の特定法が報告されている[3)]。また Tri5、Tri6などの遺伝子領域を用いて、毒素産生菌の定量的な検出法（リアルタイム PCR 法：qPCR）が報告されている[2)]。本研究では qPCR 法を用いて麦類の赤かび毒素を定量する方法を開発し、赤かび毒素とかびを専門としない農業技術者が実際に汎用することにより安全な麦類の供給に貢献することを目的とする。

イ　研究方法

（ア）罹病した麦粒から赤かび病菌 DNA の簡易抽出

市販されている DNA 抽出キットを用いて、毒素産生性の赤かび病菌で汚染された小麦および大麦から目的の赤かび菌 DNA を短時間で抽出できるキットの選別とその条件を検討した。また、抽出した DNA を用いて赤かび毒素の生合成関連遺伝子である Tri6領域を PCR 法で検出し、得られた DNA の有用性を確認した。

（イ）赤かび毒素の qPCR 定量法に適するプライマー設計

既報[1),2)]のプライマー（Tox5、Tri6）を用いて qPCR を行うとともに、新たな qPCR 定量用プライマーを設計するため Web site （NCBI）より赤かび毒素の生合成に関与する遺伝子配列を入手し、Primer3を用いて qPCR 用プライマーを設計して BLAST 解析から実験に供するプライマーを選択した。また圃場から入手した麦類に含まれる赤かび毒素を化学分析し、qPCR の結果と相関性を検討した。なお、qPCR は SYBR Premix Ex Taq（タカラバイオ社）で用い、条件等は標準プロトコールに準拠した。なお、デオキシニバレノール分析は ELISA と HPLC、ニバレノール分析は HPLC のみで行った。

（ウ）赤かび毒素産生菌のケモタイプ識別用プライマーによる qPCR

デオキシニバレノールとニバレノールが個別に検出、定量できるかどうかを検討するために既報[3)]の Tri7、Tri13領域の PCR 用プライマー遺伝子を用いて qPCR を行い、赤かび毒素の個別定量の可能性を検討した。

ウ　研究結果

（ア）諸種の市販キットの中より短時間で DNA 抽出が可能な FastDNA Kit および FastDNA Spin Kit for Soil（フナコシ社取扱品）を用いて九州沖縄農研から入手した赤かび罹病小麦および大麦で検討したところ、どちらのキットでも PCR 可能な DNA が抽出され、赤かび毒素の生合成に関与する遺伝子群の中で、遺伝子発現を制御する Tri6領域のプライマーを用いて PCR を行ったところ良好な結果が得られた。今後の研究には収量と純度などを考慮して植物組織用抽出液による DNA 抽出法が適していると判断した（図2503-1）。

（イ）供試した既報の Tox5および Tri6の qPCR 用プライマーは報告とほぼ同様な結果が得られたが、標準 DNA 溶液の低濃度では増幅が不安定で、定量値に信頼性が持てなかった。また既報の Tri6プライマーは化学分析による汚染量と比較するとほとんど汚染がない試料の数値が高かった。Tri6ならびに Tri10領域から新たに qPCR 用にプライマーに設計して測定したところ上記の問題点がかなり改善され、低濃度の標準 DNA 溶液でも良好な増幅を示した（図2503-2，図 2503-3）。両者を比較すると Tri10プライマーの方が HPLC データとの相関性で Tri6-2プライマーより若干良かった。しかし、どのプライマーを用いた qPCR も化学分析と同等な定量精度は期待できなかった。

（ウ）既に報告されている文献から、デオキシニバレノールおよびニバレノールの 2 つのケモタイプをもつ赤かび病菌 *F. graminearum* を識別するプライマーTri7および Tri13を用いて qPCR を行ったところデオキシニバレノールタイプのみを検出する Tri7プライマーは増幅が一定せず、検量線を作成することがが全く出来なかった。一方、ニバレノールタイプのみを検出する Tri13プライマーは良好な増幅が認められたが（図2503-4）、低濃度の標準 DNA 溶液では増幅が不安定でそれより高い濃度の標準 DNA 溶液から作成された検量線に乗らなかった。また定性 PCR 法ではニバレノールのみが検出されるプライマーとして報告されていたが、デオキシニバレノールのみしか含まない小麦試料でも増幅曲線が認められ、ニバレノールのみの選択的な qPCR 用プライマーとして用いることは出来ないと判断した。

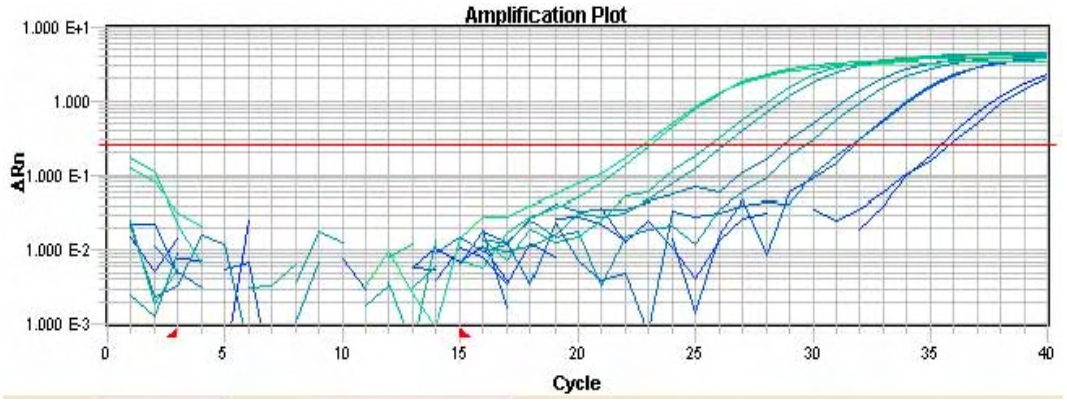


図2503-1　Tri6-2プライマーの増幅曲線

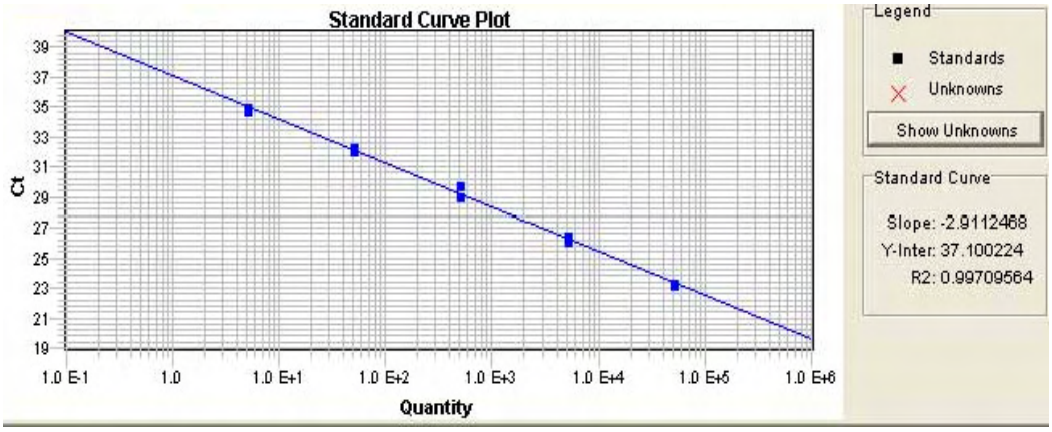


図2503-2　Tri6-2プライマーの検量線

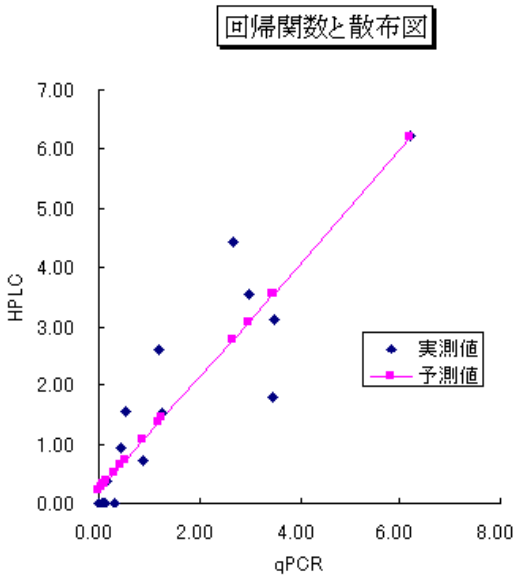


図2503-3　HPLC と qPCR の相関性（単位:ppm）

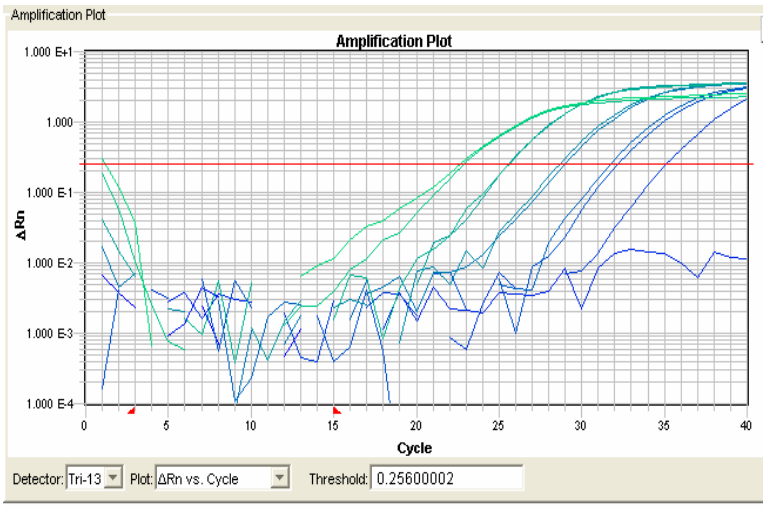


図2503-4　Tri13プライマーの増幅曲線

エ　考　察

qPCR による赤かび毒素の遺伝子定量法は、得られた DNA 中の対象遺伝子の量を測定しているので、菌体量の増加との関係が予想された。今回赤かび毒素生合成に関連する遺伝子領域から qPCR 用プローブを作製して赤かび毒素との定量性を比較してみたが、得られたデータのうち、いくつかの例外を除くと標的遺伝子量の増加と産生される毒素量の間には相関性があり、遺伝子定量からある程度汚染量を予測することは可能であると考えられた。しかし、どの領

域で qPCR 用プライマーを作製しても毒素量とある程度の相関性が示されたことから、化学分析のような定量精度を求めることは難しいと判断した。今回用いた qPCR のうち、Tri10領域から設計したプライマーはそれ以外のプライマーと比べて、得られる検量線の再現性がよく、他のプライマーでも認められる毒素量との不一致性は残るが、赤かび菌の汚染と圃場内での罹病の広がりの把握、および赤かび毒素の圃場内汚染量を推測するには有用であると考えられた。

オ　今後の課題

qPCR 法による遺伝子定量は DNA という設計図の存在量を測定する手法なので、対象の赤かび菌に内在する毒素産生能を調べることはできるが、毒素の産生性には環境条件が影響するため、実際に産生される毒素量までを予測することは難しい。今後、環境条件の影響を反映する移動性あるいは変異多発性の遺伝子領域を見出すことができるならば、遺伝子定量して得られた数値を毒素産生性と一致させる補正が可能になると考えられる。

カ　要　約

市販 DNA 抽出キット FastDNA Kit は簡易に罹病した麦粒から赤かび菌の遺伝子を抽出するのに適していた。赤かび毒素生合成に関連する遺伝子領域から qPCR 用プローブを作製して遺伝子定量を行ったところ、標的遺伝子量の増加と産生される毒素量の間には高い相関性があり、ある程度赤かび毒素汚染量を予測することは可能であると考えられた。

キ　引用文献

1）. Bluhm, B. H., Cousin, M. A. and Woloshuk, C. P. 2004 Multiplex real-time PCR detection of fumonisin-producing and trichothecene-producing groups of *Fusarium* species. J. Fd. Protect. 67:536-543.

2）. Schnerr, H., Vogel, R. F. and Niessen, L. 2002. Correlation between DNA of trichothecene-producing *Fusarium* species and deoxynivalenol concentrations in wheat-samples. Lett. Appl. Microbiol. 35:121-125.

3）. Waalwijk, C., Kastelein, P., de Vries, I., Kerenyi, Z., van der Lee, T., Hesselink, T., Kohl, J. and Kema, G. 2003. Major changes in *Fusarium* spp. In wheat in the Netherlands.

研究担当者（杉浦義紹）

4　赤かび病菌の質に関する全国サーベイシステムの確立

ア　研究目的

赤かび病菌の質を調べるには多大の労力と費用がかかり、多数の菌を調べて全国の状況を明らかにすることはできなかった。そこで本研究では、赤かび病菌の質に関して簡易診断法を開発、実用化することにより全国サーベイシステムの確立を目的とした。

イ　研究方法

（ｱ）Tri3及び Tri12遺伝子を標的とする Multiplex PCR（Ward *et al* 2002）による毒素タイプ*1の簡易診断法：*Fusarium graminearum* 種複合体149株について米培地における毒素産生で判定された毒素タイプと簡易診断法で判定された毒素タイプの結果を比較した。

（ｲ）*F. graminearum* 種複合体*2における種の簡易診断法：日本産 *F. graminearum* 種複合体25株の Reductase 遺伝子あるいは Histone H3遺伝子をシーケンスした。その結果をもとに *Fusarium asiaticum* と *Fusarium graminearum* s. str. の簡易診断が可能な PCR-RFLP 法（His/*Sty* I、His/*Eco*R V）を開発した。

（ｳ）全国の赤かび病菌の質的調査：マルチウェルプレートを利用して2001-2004年に北海道から鹿児島県まで35道府県のコムギ及びオオムギから分離された298株について種と毒素タイプを調べた。

ウ　研究結果

（ｱ）Multiplex PCR による毒素タイプの簡易診断法：米培地で NIV より DON を多く産生した69株は、簡易診断法で3ADON あるいは15ADON タイプと診断された。米培地で DON より NIV を多く産生した80株（ほぼ同等の１株を含む）は１株を除いて簡易診断法で NIV タイプと診断された。また、米培地で3ADON、15ADON、NIV の産生を調べた９株は産生された毒素によるタイプの判定結果と簡易診断法によるタイプの判定結果が全て一致した。

（ｲ）*F. graminearum* 種複合体における種の簡易診断法：Red/*Mse* I、His/*Sty* I（図2504-1上段）は *F. asiaticum* に特異的パターンを示した。His/*Eco*R V（図2504-1下段）は *F. graminearum* s. str. に特異的パターンを示した。

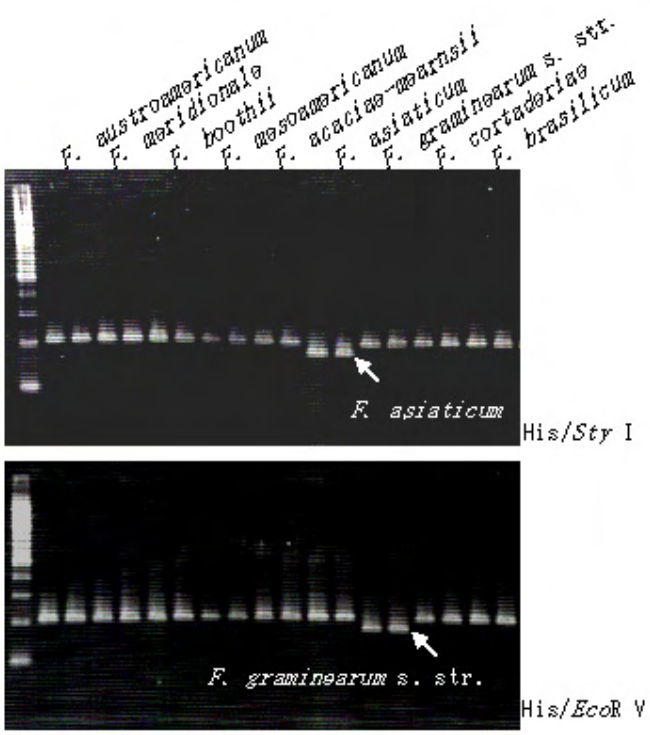


図2504-1　*Fusarium graminearum* 種複合体における *F. asiaticum*　（His/*Sty* I）と *F. graminearum* s. str.　（His/*Eco*R V）の簡易診断法

種複合体内の全9種についてそれぞれ2株づつ用いて特異性を調べた。H3STYI primer（5'-AGCATCACCYGAACATCGCATCATCCCATG-3'）とH3R1 primer（5'-TTGGACTGGATRGTAACACGC-3'）を用いてPCR後、*Sty* I（上段）あるいは *Eco*R V（下段）で処理して2％メタファーアガロースゲル電気泳動に供試した。一番左のレーンはサイズマーカー（New England BioLabs社製の100bp DNA Ladder）で、下から順に100、200、300bp。

(ｳ) 全国の赤かび病菌の質的調査：His/*Sty* I及びHis/*Eco*R Vにより298株の種を判定したところ、50株が *F. graminearum* s. str.、245株が *F. asiaticum*、3株は判定不能であった。分離地のデータから、日本の北部（北海道）では *F. graminearum* s. str.、南部では *F. asiaticum* が優先種となっており、東北地方には両種が混在していることが明らかとなった（表2504-1）。但し、長野県は周囲の県がほとんど *F. asiaticum* であったのに対し、5株全てが *F. graminearum* s. str. であった。Multiplex PCRによりこれらの毒素タイプを診断したところ、*F. graminearum* s. str. は、NIVタイプが0株、3ADONタイプが36株、15ADONタイプが14株であった（表2504-1）。一方、*F. asiaticum* は、NIVタイプが172株、3ADONタイプが72株（但し、米培地と簡易診断で結果が異なった1株を含む）、15ADONタイプが1株であった（表2504-1）。分離地との関係を調べてみると、*F. asiaticum* については東日本においてNIVタイプが多く、西日本、特に九州地方になるに従って3ADONタイプが多くなる傾向が見られた（表2504-1）。

表2504-1　各県の *Fusarium. graminearum* 種複合体[1)] とトリコテセン系毒素タイプ[2)]

県	*F. graminearum* s. str.				*F. asiaticum*				調査株数
	NIV	3ADON	15ADON	計	NIV	3ADON	15ADON	計	総計
北海道	0	16	3	19	1	0	0	1	22[3)]
青森	0	3	3	6	0	0	0	0	6
岩手	0	5	2	7	4	0	0	4	11
宮城	0	3	0	3	4	0	0	4	7
山形	0	1	0	1	2	0	0	2	3
福島	0	3	1	4	2	0	0	2	6
茨城	0	1	0	1	4	0	0	4	5
栃木	0	0	0	0	2	0	0	2	2
埼玉	0	0	0	0	2	0	0	2	2
千葉	0	0	0	0	4	1	0	5	5
富山	0	0	0	0	6	0	0	6	6
福井	0	0	0	0	4	0	0	4	4
長野	0	1	4	5	0	0	0	0	5
岐阜	0	0	0	0	18	0	0	18	18
静岡	0	0	0	0	3	1	0	4	4
愛知	0	0	1	1	4	1	0	5	6
三重	0	0	0	0	4	2	0	6	6
滋賀	0	0	0	0	17	2	0	19	19
京都	0	0	0	0	0	1	0	1	1
兵庫	0	0	0	0	5	1	0	6	6
奈良	0	0	0	0	4	2	0	6	6
鳥取	0	0	0	0	8	1	0	9	9
島根	0	0	0	0	5	1	0	6	6
岡山	0	0	0	0	14	2[4)]	0	16	16
広島	0	1	1	2	3	2	0	5	7
山口	0	0	0	0	3	3	0	6	6
香川	0	0	0	0	6	0	0	6	6
愛媛	0	1	0	1	8	3	0	11	12
高知	0	0	0	0	1	1	0	2	3[5)]
福岡	0	0	0	0	8	5	0	13	13
佐賀	0	0	0	0	8	8	0	16	16
長崎	0	0	0	0	4	15	0	19	19
熊本	0	0	0	0	7	11	1	19	19
大分	0	0	0	0	6	7	0	13	13
鹿児島	0	0	0	0	1	2	0	3	3

1）種については Histone H3遺伝子を標的とする簡易診断法で同定

2）毒素タイプについては Tri3及び Tri12遺伝子を標的とする簡易診断法で判定

3）Histone H3遺伝子を標的とする簡易診断法で種の同定が不可能だった 2 株を含む。それら 2 株は毒素タイプの簡易診断法で15ADON タイプ

4）但し、米培地で NIV タイプと診断された 1 株を含む

5）Histone H3遺伝子を標的とする簡易診断法で種の同定が不可能だった 1 株を含む。その株は毒素タイプの簡易診断法で NIV タイプ

*1：*Fusarium graminearum* 種複合体においては主要に産生されるトリコテセン系毒素が菌株レベルで異なる。大きくニバレノールを主に産生する NIV タイプとデオキシニバレノールを主に産生する DON タイプに分けられる。DON タイプについては DON に加えて 3 位がアセチル化された DON を産生する3ADON タイプと15位がアセチル化された DON を産生する15ADON タイプに分けられる。

*2：ここで *F. graminearum* 種複合体とは旧来の *F. graminearum* Schwabe（有性世代: *Gibberella zeae*）種が少なくとも *F. austroamericanum*、*F. meridionale*、*F. boothii*、*F. mesoamericanum*、*F. acaciae-mearnsii*、*F. asiaticum*、*F. graminearum* s. str.、*F. cortaderiae*、*F. brasilicum* という複数の種（O'Donnell *et al* 2004）で構成されていること反映して用いられている言葉である。

エ　考　察

(ア) 赤かび病の主要病原菌である *F. graminearum* は近年の世界各国で収集された菌の分子系統学的解析により、少なくとも9種で構成される種複合体であることが明らかにされている(O'Donnell *et al* 2000, O'Donnell *et al* 2004)。これまで日本からはそのうちの一種である *F. asiaticum* が検出されていた(O'Donnell *et al* 2000, O'Donnell *et al* 2004)。今回の研究では日本に *F. asiaticum* に加えて *F. graminearum* s. str. も存在することを示している。更に、これらの種は東北地方において顕著な混在が認められるものの、*F. graminearum* s. str. は主に北部、*F. asiaticum* は主に南部から分離されており、地理的分布に違いがあった。地理的分布の違いには温度の関与が予想されるが、両種において菌糸伸長の最適温度の違いはないとされている(青木、私信)。一方、米国においてはこれまで *F. graminearum* s. str. が検出されていたが、昨年ルイジアナ州において *F. asiaticum* の存在が認められた(Gale *et al* 2005b)。

(イ) *F. graminearum* 種複合体は菌株ごとに毒素タイプが異なることが知られている。毒素タイプを調べるには米培地で産生した毒素をGC-Massなどで解析する必要があった。Ward *et al* (2002) は Tri3及び Tri12遺伝子を標的とする Multiplex PCR を開発しており、今回日本産菌株を用いた研究では調べたほぼ全ての株においてMultiplex PCRによる毒素タイプ判定結果と米培地による毒素タイプ判定結果が一致した。これにより多数検体の毒素タイプ判定が可能となった。これにより今回の研究で日本産 *F. graminearum* s. str. と *F. asiaticum* の毒素タイプ構成が異なることが示された。*F. graminearum* s. str. においてはNIV、3ADON、15ADONタイプの存在が知られているが(Ward *et al* 2002)、今回調べた日本産 *F. graminearum* s. str. の50株中にNIVは検出されておらず、同種であっても毒素タイプ構成は地域集団によって異なる可能性が考えられた。*F. graminearum* s. str. と *F. asiaticum* は種内の菌株同士(Suga 2005, Gale *et al* 2005a)だけでなく実験レベルでは種間の菌株同士でも交配可能であることが示されている(Jurgenson *et al* 2002)。また、*F. graminearum* 種複合体は比較的小さな圃場でも遺伝的多様性が高いことも示されており(須賀 2004)、混在地域ではこれらの種間交配によって遺伝的多様性を生じている可能性も考えられる。しかし、両種が分子系統学的に明確に異なる集団として識別されていることはこれらの間に高度な遺伝的交流は生じていないことを示唆しており(須賀 2005)、本研究で認められた両種における毒素タイプ構成比の明確な違いもそれを支持している。

オ　今後の課題

(ア) 本研究で種とトリコテセン系毒素タイプに関する簡易診断法を開発したことで、日本全体のマクロ的な状況を明らかにすることができた。今後は局所の菌集団の年次変動に焦点をあてることでミクロ的な状況を明らかにする必要がある。ここでは種と毒素タイプだけでなく、既に開発済みのマイクロサテライトマーカー(Suga *et al* 2004)によるクローン(個体)分析が課題となる。

(イ) 赤かび病菌は菌株ごとに病原性が異なる。病原性の強い株は穂全体に伸展してマイコトキシン汚染粒率を上昇させる。また、現在の赤かび病防除は主に農薬に頼っており、農薬耐性菌の出現、拡大は大きな問題である。既に国内の *F. asiaticum* においてチオファネートメチル耐性菌の存在が報告されており、早期に簡易診断法の開発が必要となっている。ここでは異菌株間の交配を利用してチオファネートメチル耐性に連鎖するDNAマーカーの探索が今後の課題となっている。

カ　要　約

(ア) Tri12遺伝子と Tri3遺伝子を標的としたMultiplex PCR(Ward *et al* 2002)による *F. graminearum* 種複合体の毒素タイピングが日本産菌の解析に有効であることを確認した。また、*F. graminearum* 種複合体において *F. asiaticum* と *F. graminearum* s. str. を同定するための Histone H3遺伝子を標的としたPCR-RFLP法を開発した。

(イ) 2001-2004年に日本全国から収集した菌の種を調べたところ、北部(北海道)は *F. graminearum* s. str.、南部は *F. asiaticum* が優先種となっており、東北地方では両種が混在していた。また、*F. graminearum* s. str. と *F. asiaticum* では毒素タイプ構成が明確に異なっていた。

キ　引用文献

1) Gale LR, Bryant JD, Calvo S, Giese H, Katan T, O'Donnell K, Suga H, Taga M, Usgaard TR, Ward TJ and Kistler HC 2005a. Chromosome

complement of the fungal plant pathogen *Fusarium graminearum* based on genetic and physical mapping and cytological observations. Genetics 171:905-1001.

2) Gale LR, Ward TJ, O'Donnell K, Harrison SA and Kistler HC 2005b. Fusarium head blight of wheat in Louisiana is caused largely by nivalenol producers of *Fusarium graminearum* amd *Fusarium asiaticum*. Proceedings of the 2005 National Fusarium Head Blight Forum 159. (Abstr.)

3) Jurgenson JE, Bowden RL, Zeller KA, Leslie JF, Alexander NJ and Plattner RD 2002. A genetic map of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). Genetics 160:1451-1460.

4) O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK and Casper HH 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:7905-7910.

5) O'Donnell K, Ward TJ, Geiser DM, Kistler HC and Aoki T 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. Fungal Genet. Biol. 41:600-623.

6) 須賀晴久 2004. ムギ類赤かび病菌 *Fusarium graminearum* のゲノム解析の現状. 植物防疫 58:199-202.

7) Suga H, Gale LR and Kistler HC 2004. Development of VNTR markers for two *Fusarium graminearum* clade species. Molecular Ecology Notes 4:468-470.

8) Suga H 2005. Genomic analyses and their application in *Fusarium graminearum*. Mycotoxins 55:65-71.

9) 須賀晴久 2005. 植物病原菌の分子系統樹-そのシステムと見方-(5) *Fusarium* 菌. 植物防疫 59:355-360.

10) Ward TJ, Bielawski JP, Kistler HC, Sullivan E and O'Donnell K 2002. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:9278-9283.

研究担当者(須賀晴久*)

5 栽培技術等による赤かび病かび毒のリスク低減技術の開発

ア 研究目的

小麦の調製加工工程において、正常粒から赤かび病汚染粒を除去するための色彩選別技術及びかび毒濃度が高いフスマ部分を除去する精麦技術を開発する。

イ 研究方法

(ア) 色彩選別技術における研究方法

2003年度では、色彩選別技術において、正常粒と汚染粒を識別するのに有効な分光スペクトルと検出方式を明らかにし、マジックソーターを用いて可視光域1波長による赤かび汚染粒の選別性能を検証した。

2004年度では、色彩選別技術において、正常粒と外観上に色の差が見られる赤かび病汚染粒の色分布を明らかにし、フルカラーベルトソーターを用いて可視光域3波長による選別性能を検証した。

2005年度では、マジックソーターを用いて近赤外光域1波長での選別の効果を検証するとともに、フルカラーベルトソーターを用いた可視光域3波長での選別との比較を行った。

尚、正常粒と赤かび病汚染粒の反射分光特性および選別に使用した波長域を図2505-1に示す。

(イ) 精麦技術における研究方法

精麦技術においては、最適精麦歩留りにした赤かび病汚染粒を試験製粉して、粉状態におけるDON濃度の低減効果を確認した。

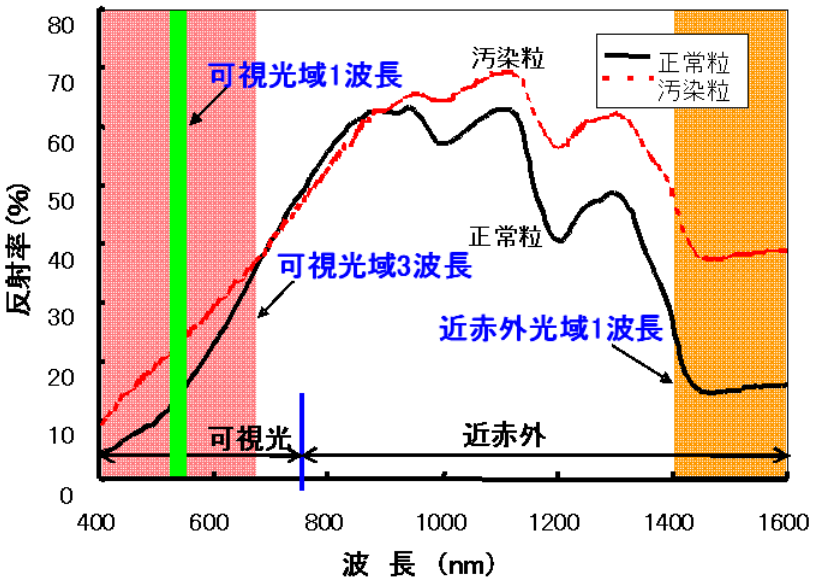


図2505-1　正常粒と赤かび病汚染粒の反射分光特性および選別に使用した波長域

ウ　研究結果

(ｱ) 色彩選別技術における研究結果

マジックソーターでの可視光域1波長での選別と、フルカラーベルトソーターによる可視光域3波長での選別結果を比較すると、フルカラーベルトソーターでの可視光域3波長の選別の方が、DON濃度をより低減することができた（図2505-2）。

マジックソーターを用いて近赤外光域1波長で赤かび汚染粒の識別及び選別を行った結果、原料のDON濃度低減に効果的であることが分かった。一例を挙げると、原料2.7 ppmのものが良品側0.5 ppm、不良品側15.7 ppmに選別できた。

また、フルカラーベルトソーターによる可視光域3波長での選別と、マジックソーターでの近赤外光域1波長での選別結果を比較すると、フルカラーベルトソーターでの可視光域3波長の選別の方が、DON濃度をより低減することができた（図2505-3）。

(ｲ) 精麦技術における研究結果

精麦製粉を行うことにより、小麦粒および小麦粉のDON濃度を低減することが可能であった。精麦歩留りは85%前後が最適であり（図2505-4）、試験結果の一例を挙げると、小麦粒で原料1.6 ppmのものが0.7ppmに、小麦粉で1.7 ppmの原料を精麦した場合、累積粉歩留り57.9%で累積DON濃度0.9 ppmに、精麦無しの場合、累積粉歩留り36.3%で累積DON濃度1.1 ppmであった（図2505-5）。

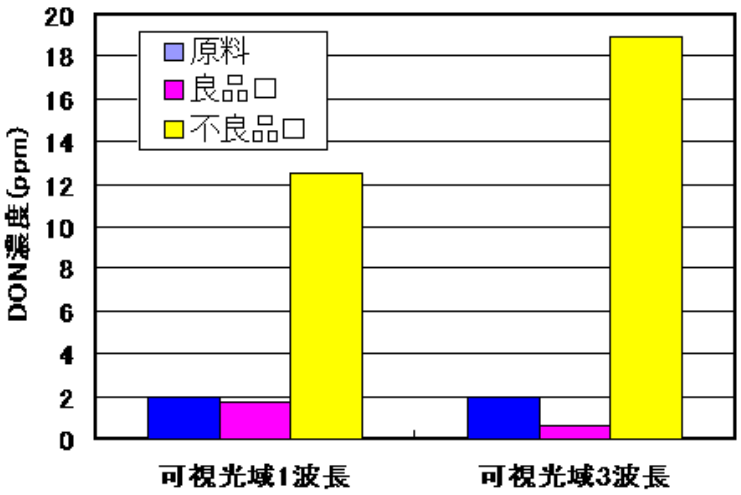


図2505-2　可視光域の識別波長の違いによる赤かび病汚染粒の選別結果

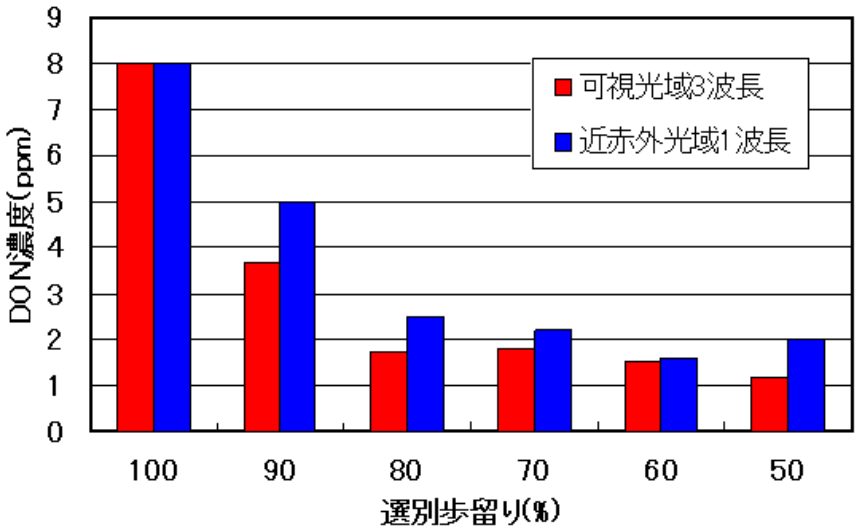


図2505-3　選別歩留りの違いによる可視光域 3 波長および近赤外光域 1 波長による赤かび病汚染粒の選別結果の比較

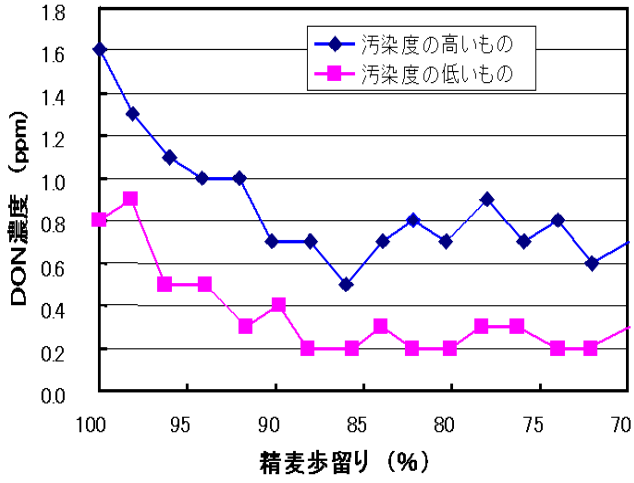


図2505-4　精麦歩留りと DON 濃度の関係

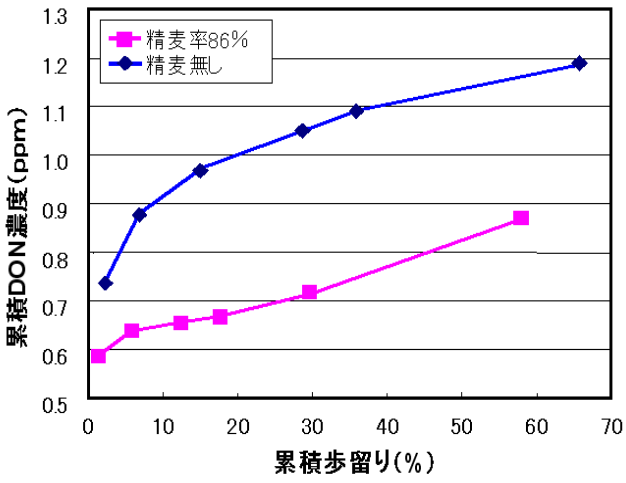


図2505-5　精麦歩留りと DON 濃度の関係

エ　考　察

(ア) 色彩選別技術における研究成果

可視光域や近赤外光域を用いた色彩選別機により、原料から赤かび病汚染粒を除去し、DON 濃度を低減できることが確認できた。

(イ) 精麦技術における研究成果

精麦製粉を行うことにより、小麦粒および小麦粉の DON 濃度を低減できることが確認できた。

オ　今後の課題

(ア) DON 濃度の低減効果を更に高めるために、紫外光域の利用および透過光を用いた内部品質による選別について検証するとともに、各波長を組み合わせた最適な選別方法を確立する。

(イ) 2005年度東北地方において被害の大きかった穂発芽粒や黒かび病汚染粒を効率よく除去する方法、並びにアミロ値の低下による小麦品質の低下防止について検討する。

カ　要　約

色彩選別技術としては、可視光域や近赤外光域を用いた色彩選別機により、原料から赤かび病汚染粒を除去し、DON 濃度を低減できることを確認した。

精麦技術としては、最適精麦歩留りにした赤かび病汚染粒を用いた試験製粉により、小麦粒および小麦粉の DON 濃度を低減できることを確認した。

研究担当者（松島秀昭、伊藤隆文、原正純、谷本宏、細藤慎司、高山篤*、立石芳和、河野元信）

6　北海道での小麦赤かび病激発時におけるマイコトキシン汚染リスク低減技術の開発

ア　研究目的

北海道の秋まき小麦で赤かび病を効率的に防除し、かび毒の汚染量を低減させる薬剤防除技術の確立をめざし、薬剤のかび毒低減効果の査定、散布回数、散布時期を検討するとともに、北海道の *Fusarium graminearum* のかび毒産生能を把握する。

イ　研究方法

(ｱ) 薬剤散布試験

a　接種

かび毒汚染リスクの高い条件で検討するため *F. graminearum*（デオキシニバレノール（DON）産生菌）を接種した。2002、2003年は *F. graminearum* の分生胞子懸濁液（1×10^4個/ml）を10a あたり100L 相当量を噴霧接種し、2004、2005年は *F. graminearum* 培養えん麦粒を畦間にばらまき感染源とした。

b　薬剤散布

薬剤散布は背負式噴霧器を用い10a あたり100L 相当量を散布した。各薬剤には展着剤（ポオキシエチレンノニルフェニルエーテル）を5000倍となるよう添加した。全穂の５～10％が開花した時期を開花始と定義し、薬剤散布時期の目安とした。

c　調査方法

開花始の約30日後に発病小穂率を調査した。簡易的に発生菌種を調査するため、発病調査後に発病穂を採取し、スポロドキアを形成している小穂から胞子をかき取り、大型分生子の形態を顕微鏡観察し菌種を特定した。2004、2005年はグリセリンゼリーを塗布した胞子トラップを試験圃場に設置し、開花始から収穫までの *F. graminearum* の子のう胞子飛散量を調査した。

脱穀した麦粒は2.2mm のふるいで調整して整粒とし、赤かび粒率、かび毒分析に用いた。また整粒から赤かび粒を除去した外観上健全な子実を外観健全粒（以後外観健全粒）として、かび毒分析および *F. graminearum* の分離率調査に供試した。かび毒の定量は協和メデックッス株式会社に委託し、ELISA 法により分析した。

(ｲ) 立毛中における外観健全粒中の DON 濃度の推移

F. graminearum 培養えん麦粒を接種した圃場で、開花始19、26、42日後に、無発病穂、発病穂をそれぞれ15穂ずつ採取し、外観健全粒からの *F. graminearum* の分離率、外観健全粒中の DON 濃度を調査した。DON 濃度の分析は共和メデックス社製の分析キットを用いて行った。

(ｳ) 北海道の秋まき小麦より分離された *F. graminearum* のかび毒産生能

2002年に26市町村から各１圃場を選定し、成熟期に採取した赤かび粒を素寒天培地上に置床し、20℃で５日間培養した。伸長してきた菌糸を PDA 斜面培地に移植し、赤かび病菌と思われるものを SNA（Sunthetic low nutrient agar）平板培地または CLA（Carnation leaf agar）平板培地で培養し、BLB 照射下で形成させた分生胞子、分生子柄を顕微鏡観察して同定を行った。かび毒産生能の調査は、単胞子分離した菌株を米培地で25℃、14日間培養し、分析に供試した。分析は財団法人マイコトキシン検査協会に依頼し実施した。

ウ　研究結果

(ｱ) 各種薬剤の DON 汚染低減に対する効果査定

2002～2005年の４ヶ年にわたり *F.graminearum* 接種圃で各種薬剤の DON 汚染低減効果を検討した。その結果、テブコナゾール水和剤 F、メトコナゾール乳剤、チオファネートメチル水和剤、イミノクタジン酢酸塩液剤およびチオファネートメチル水和剤とイミノクタジン酢酸塩液剤のタンクミックスは各試験年次を通し安定して防除効果が高かった（表2506-1）。一方、アゾキシストロビン水和剤 F は DON 汚染低減効果が低く、2002年の試験では無散布区を上回る DON 濃度であった。またクレソキシムメチル水和剤 F およびプロピコナゾール乳剤は、低濃度の散布で DON 汚染低減効果が低下する事例が認められた。

2002年に自然発病下で発生菌種を調査したところ、薬剤によって処理後の発生菌種割合が異なる傾向が認められ、テブコナゾール水和剤 F、メトコナゾール乳剤、チオファネートメチル水和剤散布区では、無散布区に比較して *Microdochium nivale* の割合が相対的に高かった（表2506-2）。2003年でも同様な傾向が認められ、テブコナゾール水和剤 F およびチオファネートメチル水和剤は *F.graminearum* の割合を低下させたが、*M. nivale* の割合が高く防除効果がやや劣った。整粒中の DON 濃度は *F.graminearum* の割合を低下させた２剤が低かった（図2506-1）。

表2506-1　各種薬剤のDON汚染低減効果

供試薬剤	希釈倍数	DON濃度（対無散布区100分比）						
		整粒				健全粒		
		2002	2003	2004	2005	2003	2004	2005
ｸﾚｿｷｼﾑﾒﾁﾙ水和剤F	2000		27	10	39	42	15	31
	3000	65		18	62		15	116
ｱｿﾞｷｼｽﾄﾛﾋﾞﾝ	2000	103	60	17	49	64	15	83
ﾃﾌﾞｺﾅｿﾞｰﾙ	2000	51	13	3	14	14	15	11
ﾌﾟﾛﾋﾟｺﾅｿﾞｰﾙ乳剤	1000		29	11	26	36	15	25
	2000	81		22	48		47	48
ﾒﾄｺﾅｿﾞｰﾙ乳剤	1000			2	6		15	6
	1500	16	9	3	8	11	15	7
ﾁｵﾌｧﾈｰﾄﾒﾁﾙ水和剤	1500	32	9	13	3	12	15	5
ｲﾐﾉｸﾀｼﾞﾝ酢酸塩液剤	1000		23	12	23	28	15	18
	2000	65		12	32		15	26
ﾁｵﾌｧﾈｰﾒﾁﾙ 水和剤+ｲﾐﾉｸﾀｼﾞﾝ酢酸塩液剤	1500 +2000	15	3	5		5	15	
無散布区のDON濃度(ppm)		6.40	12.60	2.36	25.47	6.59	0.33	4.86

注）供試品種：「ハルユタカ」2002、2005年、「ホクシン」2003、2004年

表2506-2　薬剤散布後の発生菌種割合
（2002年、自然発病）

供試薬剤名	希釈倍数	菌種割合（%）[1)]			
		F.gra	F.ave	F.cul	M.niv
クレソキシムメチル水和剤F	3000	38.5	53.8	3.8	3.8
アゾキシストロビン水和剤F	2000	63.0	29.6	7.4	0.0
テブコナゾール水和剤F	2000	36.4	39.4	0.0	24.2
プロピコナゾール乳剤	2000	42.3	46.2	3.8	7.7
メトコナゾール乳剤	1500	36.4	40.9	4.5	18.2
チオファネートメチル水和剤	1500	25.0	53.6	3.6	17.9
イミノクタジン酢酸塩液剤	2000	29.2	66.7	0.0	4.2
イミノクタジン酢酸塩液剤+チオファネートメチル水和剤	2000＋1500	26.1	69.6	0.0	4.3
無散布		34.6	57.7	3.8	3.8

1)F.gra:*F.graminearum*、F.ave:*F.avenaceum*、F.cul:*F.culmorum*、M.niv:*M.nivale*

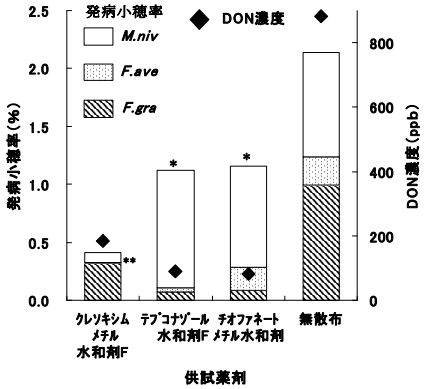


図2506-1　薬剤散布後の発生菌種とDON濃度
（2003年、自然発病）

注1）*、**は無散布区と比較してそれぞれ５%、１%で有意差あり、

(ｲ) 薬剤散布時期と散布回数の検討

出穂期、開花始および開花始7日後のそれぞれの時期にテブコナゾール水和剤Fを1回散布し防除効果を比較した（表2506-3）。出穂期散布区の発病小穂率は2.8%であり、開花始（1.94%）および7日後の散布区（1.78%）と比較して防除効果が低かった。DON濃度についても同様な傾向が認められ、出穂期のDON濃度は6.60 ppmと開花始（3.61 ppm）および7日後（2.94 ppm）と比較して高く、開花前の薬剤散布は明らかに防除効果が劣った。

2回散布区の発病小穂率を比較すると、開花始と7日後の散布区の発病小穂率は0.72%と最も低く、開花始7日後と14日後の散布区は0.92%、開花始14日後と21日後の散布区は2.19%と散布時期が遅くなるにつれて防除効果が低くなる傾向が認められた。DON濃度についても開花始と7日後の散布区が1.28 ppmと最も低く、発病小穂率と同様な傾向であった。

開花始を散布開始時期として、1～4回散布区の防除効果を比較すると、1回散布区の発病小穂率、DON濃度は1.94%、3.61 ppmと他の試験区に比べ高く防除効果は劣ったが、2回、3回、4回散布の発病小穂率およびDON濃度はそれぞれ0.72%、0.74%、0.69%および1.28 ppm、0.97 ppm、1.12 ppmと防除効果に差が認められなかった。なお試験区に設置した胞子トラップで*F.graminearum*の子のう胞子飛散量を調査したところ、開花始18日後以降から降雨が多く子のう胞子の飛散は生育後半に多く認められ、生育後半にも十分な感染圧があったものと考えられる（図2506-2）。

次に散布回数とDON濃度低減効果との関係をみた。なお、供試薬剤は現場の薬剤防除を想定し、開花始より1週間間隔で体系散布を行った。その結果2回、3回、4回散布区のDON濃度に差は認められず、無散布区と比較していずれも高い防除効果が認められた（図2506-3）。

表2506-3　散布時期と回数の違いによる防除効果の比較

散布回数	薬剤散布時期[開花始後日数] 出穂期 [-5]	開花始 [0]	[7]	[14]	[21]	発病小穂率(%)	赤かび粒率(%)	整粒のDON濃度 (ppm)	健全粒中のDON濃度 (ppm)
1回	○					2.80 (4)	8.8 (39)	6.60 (26)	1.86 (13)
		○				1.94 (34)	7.4 (49)	3.61 (60)	0.90 (58)
			○			1.78 (39)	4.2 (71)	2.94 (67)	0.64 (70)
2回	○	○				1.57 (46)	5.7 (60)	3.27 (63)	0.79 (63)
		○	○			0.72 (76)	3.7 (74)	1.28 (86)	0.49 (77)
			○	○		0.92 (69)	3.5 (76)	1.64 (82)	0.32 (85)
				○	○	2.19 (25)	9.2 (36)	5.17 (42)	0.73 (66)
3回		○	○	○		0.74 (75)	2.3 (84)	0.97 (89)	0.25 (88)
4回		○	○	○	○	0.69 (76)	2.8 (81)	1.12 (88)	0.17 (92)
無散布						2.92	14.3	8.94	2.13

注1）（　　）内の数値は防除価を示す。
注2）散布薬剤：テブコナゾール水和剤F(2000倍)

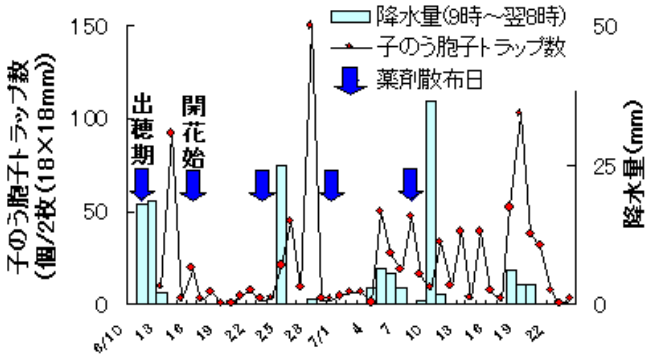


図2506-2　2005年 *F. graminearum* 接種圃場の子のう胞子の飛散量と降水量

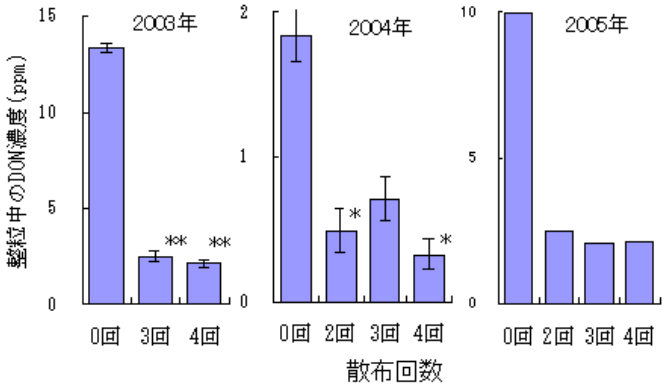


図2506-3　散布回数の違いによるDON濃度の比較

注）*、**は無散布区と比較してそれぞれ5％、1％で有意差があったことを示す。2005年は3反復を等量混合して分析した。

(ｳ) 立毛中における外観健全粒中のDON濃度の推移

外観健全粒からの *F.graminearum* の分離率およびDON濃度は収穫期に近づくにつれ増加した。これを健全穂、発病穂由来の外観健全粒に分けてみると、前者は開花26日目まで *F.graminearum* は分離されず、DONも検出されなかった。これに対し後者はからは *F.graminearum* が高率で分離され、DON濃度も高かった（図2506-4）。

(ｴ) 北海道の秋まき小麦より分離された *F.graminearum* のかび毒産生能

試験に用いた42菌株中 DON 産生菌は40菌株（95.2%）、DON/NIV 産生菌は2菌株（4.8%）であり、DON産生菌の割合が高かった(表2506-4)。一方、NIV 産生菌はいずれの地域からもの分離されなかった。

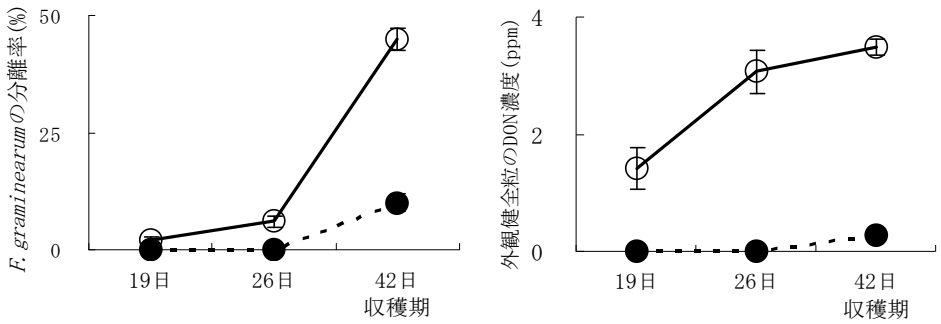


図2506-4　外観健粒からの *F.graminearum* の分離率と DON 濃度

注1）●無発病穂由来の外観健全粒、○発病穂由来の外観健全粒

表2506-4　北海道の秋まき小麦より分離した *F.graminearum* のかび毒産生能

分離地域	調　査	かび毒産生菌[1)]の分離率(%)		
	菌株数	DON産生菌	NIV産生菌	DON/NIV産生菌
道央地域	27	92.6	0.0	7.4
道東地域	15	100.0	0.0	0.0
合　計	42	95.2	0.0	4.8

注1）米培地中の DON 濃度が NIV 濃度の15倍以上を DON 産生菌、1/15以下を NIV 産生菌とした

エ　考　察

(ア) 赤かび病防除薬剤の DON 汚染低減効果について検討した。その結果、供試した薬剤のうちテブコナゾール水和剤 F、メトコナゾール乳剤、チオファネートメチル水和剤、イミノクタジン酢酸塩液剤およびチオファネートメチル水和剤とイミノクタジン酢酸塩液剤のタンクミックスは DON 濃度が低く、試験を実施した 4 ヶ年ともこれらの薬剤の効果は安定していた。一方、クレソキシムメチル水和剤 F およびプロピコナゾール乳剤は、効果は認められるものの試験年次によって効果が安定せず、特に低濃度の散布で効果が劣る事例もあったことから、先の 4 剤に比べ効果は劣るものと考えられる。アゾキシストロビン水和剤 F は DON 汚染低減効果が低かった。本剤は無散布区より高い DON 濃度を示す試験例も報告されており[1)]、赤かび病防除に対しては使用しないことが適当と考えられた。

テブコナゾール水和剤 F、メトコナゾール乳剤およびチオファネートメチル水和剤の散布後は無散布区と比べ *M. nivale* の割合が高い傾向を示した。チオファネートメチル水和剤については *M. nivale* が引き起こす紅色雪腐病で薬剤耐性菌が確認されており、北海道内に広く分布している。Jennings[2)] らもテブコナゾール水和剤 F およびメトコナゾール乳剤散布後に同様な発生菌種割合の変化について報告しており、*F. graminearm* と *M. nivale* では薬剤の感受性が異なるものと考えられる。

(イ) 薬剤散布回数と赤かび病の発生程度および DON 濃度との関係をみると、2 ～ 4 回散布の範囲では大きな差が認められず、散布回数を多くしても防除効果は向上しなかった。試験を実施した平成17年は生育後半に降雨が多く、子のう胞子も生育後半に多く飛散したが、このような条件下でも後期散布の効果は低かったと考えられる。

(ウ) 発病穂より採取した外観健全粒からは *F.graminearum* が高頻度で分離され、DON 濃度も高かった。これに対し無発病穂より採取した外観健全粒では、成熟期に *F.graminearum* が分離されたものの、その割合は発病穂に比べ低く DON 濃度も低かった。発病穂由来の外観健全粒は高濃度で DON に汚染され

ており、外観健全粒のDON汚染の主体であると考えられる。

表2506-3で開花始から散布した2回、3回、4回散布区の外観健全粒のDON濃度は、散布回数の多い試験区でわずかに低い傾向が認められたことから、後半の薬剤散布が発病穂内のDON汚染に効果があった可能性がある。しかし、その程度は低くDON汚染低減には開花時期の赤かび病の感染を防止することが最も重要な対策であると考えられる。

（ェ）北海道の秋まき小麦より分離された*F.graminearum*はDON産生菌が主体であり、現在のところNIV産生菌の割合は低いと考えられる。しかしながら中島らが*F.graminearum*の種子伝染を確認しており、かび毒産生性の異なる菌種が汚染種子によって移動する危険性があることを指摘している。分離菌のかび毒産生能の調査は定期的に行う必要があると考えている。

オ　今後の課題

赤かび病の発生量とかび毒による汚染量をできる限り低く抑えることを目的として、薬剤の効果査定、散布開始時期および回数を設定した。今後は本試験で使用した品種より抵抗性が付与された品種が普及する見込みであり、品種の抵抗性に対応したかび毒汚染対策について検討する必要がある。

カ　要　約

テブコナゾール水和剤F、メトコナゾール乳剤、チオファネートメチル水和剤、イミノクタジン酢酸塩液剤およびチオファネートメチル水和剤とイミノクタジン酢酸塩液剤のタンクミックスはDON汚染低減効果が高く、その効果は各年次で安定していた。しかし、これらのうちテブコナゾール水和剤F、メトコナゾール乳剤、チオファネートメチル水和剤は*M. nivale*に対する効果が低い傾向にあった。

赤かび病防除およびDON汚染低減に有効な薬剤散布の開始時期は開花始であった。開花始から1週間間隔で2回散布すると高い効果が認められ、2回、3回、4回散布で防除効果に差は認められなかった。

発病穂由来の外観健全粒からは*F.graminearum*が高率に分離され、健全穂由来の外観健全粒と比較して高濃度でDONに汚染されていた。したがって発病穂内のDON汚染が外観健全粒のDON汚染の主要因であると考えられた。

北海道の秋まき小麦より分離された*F.graminearum*は、DON産生菌が主体であり、NIV産生菌は認められなかった。

キ　引用文献

1）Souma J. 2004. Control of deoxynivalenol contamination of spring wheat in Hokkaido. Takumi Yoshizawa ed. New horizon of mycotoxicology for assuring food safety. Japanese Association of Mycotoxicology 77-82.

2）Jennings P., Coates E. M., Turner A. J., Nicholson P. 2004. Distribution, toxin production and control of Fusarium head blight pathogens in the UK. Takumi Yoshizawa ed. New horizon of mycotoxicology for assuring food safety. Japanese Association of Mycotoxicology 69-75.

研究担当者（小澤徹*、相馬潤、清水基滋）

7　北日本における穀類赤かび病の発生実態および発病機構の解明

ア　研究目的

北日本は日本の主要な稲作地帯であるが、コムギの栽培も行われている。麦類の重要病害である赤かび病はイネにも発生することが知られており、イネ上からは比較的高頻度で赤かび病菌が検出される。また、昭和30年、陸稲で赤かび病大発生による食中毒事件が広範囲（東京、茨城、栃木、高知）で起こっている。その後、そのような報告は認められていないが、減農薬栽培の増加と食の安全性が問われる今日において、コメのかび毒汚染の実態の把握およびかび毒汚染の原因となりうる要因を明らかにすることは、食の安全上極めて重要である。本研究では、北日本の水田圃場を調査し、赤かび病の発生実態を明らかにするとともにイネにおける原因菌の同定をPCR法を用いて行った。また、分離菌をイネに接種し、発病機構を解明するとともに、イネ穂におけるマイコトキシン蓄積について解析する。

イ　研究方法

(ｱ) 北日本におけるイネ赤かび病の発生実態と原因菌の同定

北日本の水田圃場を調査し、赤かび病に感染していると思われる穂を採集した。採集した穂は、毒素産生*Fusarium*属菌特異的プライマーを用いた、籾からのダイレクトPCRにより、感染の有無を調査した。

陽性反応を示した籾から釣菌法により *Fusarium* 属菌を単胞子分離し、分離した菌の種および毒素産生遺伝子型を PCR により判定した。また、マイクロサテライトマーカーを用いて圃場内の個体群構造を解析した

(ｲ) イネにおける赤かび病感染機構の解明

イネから分離した *F. graminearum* 複合種の分生胞子懸濁液（3×10^5個/ml）16 ml を出穂始、出穂期、および穂揃い期のイネ（あきたこまち、ポット栽培イネ）に噴霧接種し、接種時期による発病程度および被害粒の発生程度を調査した。さらに、毒素産生遺伝子型および産生能の異なる菌を出穂始のイネに接種し、病原性との関連を調査した。また、赤かび病菌の籾への侵入について、走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

(ｳ) イネにおけるかび毒汚染実態および要因の解明

一般圃場より刈り取った被害イネおよび外観健全イネを自然乾燥（はざ架け）し、収穫した玄米および精米について DON, NIV, T-2および ZEN の含有量を LC/MS を用いて分析した（マイコトキシン協会委託)。また、赤かび病菌を接種し立毛時に発病が認められたイネについても同様に分析した（2003年は協和メディックスに委託)。さらに収穫後の乾燥条件が毒素蓄積に与える影響を明らかにするため、赤かび病菌を接種したイネ（あきたこまち）を収穫直後、および 1 週間水田に放置することで、感染を促した後、機械乾燥、屋内・屋外自然乾燥し、米の被害粒率を調査するとともに、毒素分析（マイコトキシン協会委託）を行った。

(ｴ) 赤かび病菌に対するイネ品種の感受性

北日本で栽培されている 9 品種（コシヒカリ、たかねみのり、あきたこまち、ひとめぼれ、ササニシキ、アキヒカリ、たつこもち、こがねもち、美山錦）に分生胞子懸濁液を出穂始から出穂期に噴霧接種し、品種による赤かび病感受性の違いについて調査した。

ウ　研究結果

(ｱ) 北日本におけるイネ赤かび病の発生実態と原因菌の同定

北日本 2 県のイネを調査し、赤かび病菌に感染していると思われる穂を採集した。採集した穂の籾は内頴が褐変あるいは籾全体が褐変しており、スポロドキアを形成しているものも認められた（写真2507-1)。発生はスズメ等により被害を受けた籾、畦畔周辺、特に水口付近で多かった。また、2004年に被害の認められた 2 圃場を2005年に調査した結果、同様の被害が確認された。滅菌水（500 µl）中に懸濁させた分生胞子からキレックス法により粗抽出した核酸を鋳型として、Bluhm らの方法により毒素産生 *Fusarium* 属菌が持つフモニシンおよびトリコテセン産生遺伝子を PCR により増幅した結果、懸濁胞子濃度が1×10^5個/ml 以上であれば検出可能であった。本方法を用いて、採集した籾から PCR を行った結果、高率に毒素産生 *Fusarium* 属菌が検出された。そこで、新たに別の 2 県のイネについても調査を行い、あわせて 4 県の被害籾から単胞子分離した赤かび病菌を PCR により同定したところ、同定されたすべての菌が *F. graminearum* 複合種であることが明らかとなっ

写真2507-1　水田圃場で確認されたイネ赤かび病

表2507-1　イネより分離した赤かび病菌の PCR による同定

採集地	A	B	C	D
全分離菌株数	76	63	46	109
F. asiaticum	61	50	46	75
NIV type[1)]	45	50	45	75
F. graminearum	15	5	0	8
DON type[2)]	14	5	0	8

1) *F. asiaticum*と同定された菌株中のNIV type
2) *F.graminearum s.str*同定された菌株中のDONtype

た。さらに、分離された菌株の毒素産生遺伝子型および種（狭義）をPCRにより判別したところ、多くの菌株がNIV産生型の*F. asiaticum*と同定され、一部がDON産生型の*F. graminearum* s. str.であることが明らかとなった（表2507-1）。

また、分離した菌についてマイクロサテライトマーカーを用いて個体識別を行い、圃場内における個体群構造を解析したところ、同一圃場、および同一の籾に異なるハプロタイプが分布していた。したがって、イネにおいてもムギと同様、圃場内で複雑な個体群構造を有していることが明らかとなった。

（イ）イネにおける赤かび病感染機構の解明

ポット栽培イネを用いた接種試験において、接種後、7－9日後から葯を中心に赤かび病菌の菌糸が観察されるとともに、籾が褐変し、内頴と外頴との間にも菌糸が観察された。籾の褐変は出穂始、および出穂期に接種した場合に多く認められた（写真2507-2, 3）。また、被害粒率は出穂期接種で最も高かったが、穂揃期接種でも被害粒が多く認められた（表2507-2）。一方、毒素産生型と病原性の関連を調査した結果、菌株によって病原力および被害粒の発生に違いが認められたが、毒素産生型および産生能との関連は認められなかった。また、走査型電子顕微鏡観察によって菌糸は籾表面を伸長し（写真2507-4）、葯骸花糸から籾内部に侵入している様子が観察された。

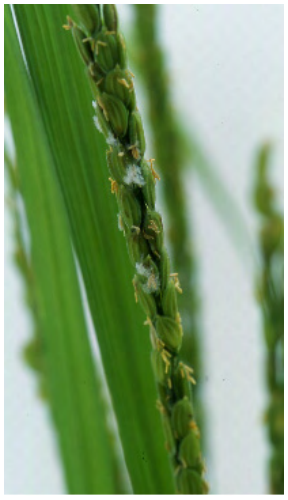


写真2507-2　接種14日後の症状

写真2507-3　接種25日後の症状

表2507-2　接種時期が籾の褐変と被害粒発生に及ぼす影響

接種時期	ポット	籾褐変率（内穎）	被害粒率(%)
出穂始	Ⅰ	4.0 (3.0)	
	Ⅱ	5.9 (5.7)	
	Ⅲ	10.7 (8.7)	
	平均	6.9 (5.8)	10.7
出穂期	Ⅰ	24.9 (7.1)	
	Ⅱ	7.2 (1.0)	
	Ⅲ	2.3 (2.3)	
	平均	11.5 (3.5)	14.2
穂揃期	Ⅰ	2.1 (0.3)	
	Ⅱ	1.8 (0.0)	
	平均	2.0 (0.2)	12.3

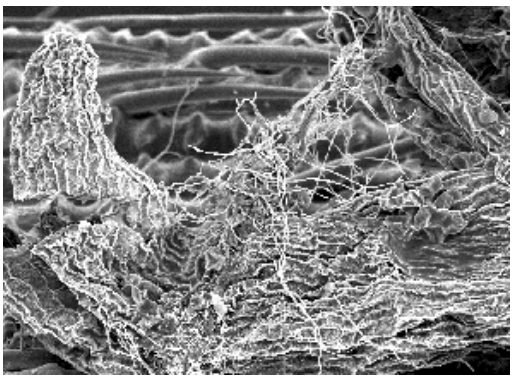


写真2507-4　葯骸上に観察される菌糸

1）１ポット当たり分生胞子懸濁液（3×105個/ml）を16 ml噴霧接種した

2）接種後のポットは25℃の湿室下で24時間維持した

3）褐変率の調査は出穂期22日後に行った

(ｳ) イネにおけるかび毒汚染実態および要因の解明

一般圃場（１圃場、品種：たかねみのり）で被害の認められた玄米からは極めて低濃度の NIV（0.09 ppm）のみ検出され、これを精米した、米からは検出されなかった。一方、被害の認められなかった２圃場（各３区）から収穫した玄米のうち１圃場の１区から低濃度の DON（0.37 ppm）、NIV（0.49 ppm）および ZEA（0.05 ppm）が検出された。また、赤かび病菌を噴霧接種したイネでは2003年では極めて低濃度の NIV が、2004年では１区においてのみ低濃度の DON および NIV が検出された（表2507-3）。

収穫後の乾燥条件の違いが被害粒率および毒素蓄積に与える影響を調査した結果、屋外で自然乾燥することで被害粒率は高くなった。また、収穫したイネを水田に放置した籾では被害粒率が高くなった。しかしながら、いずれの玄米からも毒素は検出されなかった（表2507-4）。

表2507-3　噴霧接種したイネにおける赤かび病発病度と毒素蓄積との関係

試験年	接種区	発病度[1,2)]	DON[3)]	NIV	T-2	ZEN
2003	Ⅰ	19.0	ND[4)]	0.062	ND	NT[4)]
	Ⅱ	33.0	ND	0.084	ND	NT
	Ⅲ	48.3	ND	0.116	ND	NT
2004	Ⅰ	61.4	ND	ND	ND	ND
	Ⅱ	64.0	0.49	0.28	ND	ND
	Ⅲ	67.6	ND	ND	ND	ND

1）発病度=（2/3以上罹病穂率）+0.66×（1/3-2/3罹病穂率）+0.26×（1/3以下罹病穂率）
2）調査は2003年は出穂25日後、2004年は出穂17日後に行った
3）単位 ppm　2003年は ELISA，2004年は LC/MS で分析した
4）ND:検出されず　NT:試験せず

表2507-4　乾燥条件が赤かび病被害粒発生に及ぼす影響

刈り取り後の処理	乾燥条件	被害粒率(%)[1)]
収穫後乾燥	機械乾燥	4.0
	屋内　1週間天日乾燥	5.7
	屋外　1週間天日乾燥	8.8
	屋内　2週間天日乾燥	6.1
	屋外　2週間天日乾燥	12.6
水田1週間放置	機械乾燥	15.1
	屋内　1週間天日乾燥	17.2
	屋外　1週間天日乾燥	25.9

1）玄米1000粒中の被害粒率

(ｴ) 赤かび病菌に対するイネ品種の感受性

イネ９品種の赤かび病感受性を調査した結果、NIV 産生型の *F. asiaticum* を接種した試験ではこがねもちの病斑面積率、不稔率が低かったのに対し、たかねみのり、たつこもち、および美山錦の不稔率および被害粒率が高かった。収穫後の被害玄米率はこがねもちが最も低かったのに対し、たかねみのりが最も高かった。また、DON 産生型の *F. graminearum* s. str. を接種した試験においても同様の傾向が認められた（表2507-5）。

表2507-5　イネ品種の赤かび病感受性

品種	*F. asiaticum*（NIV型）			*F. graminearum*（NIV型）		
	病斑面積率(%)	不稔率(%)	被害粒率(%)[1)]	病斑面積率(%)	不稔率(%)	被害粒率(%)
コシヒカリ	30.4	7.1	32.4	16.3	3.6	21.2
たかねみのり	46.1	11.5	33.4	23.1	1.5	29.0
あきたこまち	27.4	5.4	21.7	10.7	0.6	20.4
ひとめぼれ	29.4	6.3	27.6	6.3	0.0	18.0
ササニシキ	28.7	4.6	16.2	9.4	0.3	25.3
アキヒカリ	21.0	3.9	22.4	28.0	4.6	25.5
たつこもち	39.1	9.7	29.1	23.6	5.4	19.5
こがねもち	13.8	1.7	24.6	6.7	0.2	9.4
美山錦	36.8	7.9	23.2	29.9	5.1	26.5

1）達観による判別　2）各品種10株を供試

エ　考　察

(ｱ) 北日本におけるイネ赤かび病の発生実態と原因菌の同定

採集したイネから分離した赤かび病菌はすべて、*F.graminearum* 複合種で、いずれの県においても、NIV 産生型の *F. asiaticum* が優占して広く分布していた。ムギにおいては西日本では NIV 産生型の *F. asiaticum* が優占種であるのに対し、北海道では DON 産生型の *F. graminearum* s. str. が優占種であることが報告されている。北日本のムギでは両種が分布しており、いずれかの種の明らかな優占は認められていない。このことはイネでの分布状況とは異なっている。イネ・コムギ混作地帯での予備的な分布調査では、イネからは NIV 産生型の *F. asiaticum* が、コムギからは DON 産生型の *F. gramiearum* s. str. が高率で分離されている。イネの刈り株での子嚢胞子の形成は麦類赤かび病の伝染環において重要な役割を果たしていると考えられてきたが、少なくとも北日本においてはイネからムギへの伝染とは異なる伝染経路が存在する可能性が示唆された。このことについては今後、詳細な調査が必要である。

一方、水田における赤かび病菌の個体群構造を明らかにするため、マイクロサテライトマーカーを用いて、分離菌の個体識別を行った。その結果、同一圃場、および同一の籾に異なるハプロタイプが分布していることが明らかとなった。このことから伝染源となる胞子が分生胞子ではなく、子嚢胞子であることが示唆された。

(ｲ) イネにおける赤かび病感染機構の解明

ポット栽培イネを用いた接種試験によって、病徴再現に成功するとともに、本菌がイネに不稔を生じさせることから、病原菌であることが再認識された。籾の褐変は出穂始および出穂期に接種した場合に最も多く認められており、接種後の経日的な観察、および走査電子顕微鏡による観察においても、葯を中心に菌糸が観察されるとともに、花糸から籾への侵入が観察された。圃場での実態調査においても、水口周辺の出穂期間の長いイネでの発生が多いことからも、感染に開花日数および葯の残存日数が大きく影響していることが明らかとなった。また、穂揃期接種においても顕著な被害粒率の低下は認められず、出穂後も感染可能であることが示唆された。一方、毒素産生型、産生能と病原性との間にはいずれにおいても有意な関連は認められず、イネに対する病原性については菌株に依存していることが明らかとなった。しかしながら、毒素蓄積量については検討しておらず、今後、毒素蓄積との関連を明らかにする必要がある。

(ｳ) イネにおけるかび毒汚染実態および要因の解明

一般圃場で被害の認められたイネおよび接種イネ、いずれのイネから収穫した玄米からも、極めて低濃度の毒素が検出されたのみで、毒素が検出された玄米も精米することで全く検出されなくなった。また、収穫後の乾燥条件の違いでは自然乾燥や、登熟後の条件が被害粒率に大きく影響することは明らかになったが、いずれの場合にも毒素は検出されなかった。本試験は一般水田から採集されたイネを除き、あきたこまちのみでの事例であり、以前の赤かび病の中毒は陸稲で発生している。このことから、イネにおける毒素蓄積においてはさまざまな品種で検討する必要があるものと考えられた。

(ｴ) 赤かび病菌に対するイネ品種の感受性

イネ品種の違いによる赤かび病の感受性を調査し

た結果、接種菌にかかわらず、品種によって感受性は異なっていた。特にたかねみのりは不稔率や被害玄米率が高く、このことは水田圃場でたかねみのりに被害が多いことと一致していた。一方、本試験においてこがねもちは赤かび病菌に対する感受性が低く、不稔率、被害玄米率が最も低かった。このことからこがねもちが赤かび病菌に対して抵抗性を有している可能性が考えられる。しかし一方で、赤かび病に感染した精玄米率が高くなる可能性もあり、これが結果として玄米中の毒素量を高くすることも考えられる。今後、毒素蓄積量も含めて、品種による感受性の違いについて検討する必要があると考えられた。

オ　今後の課題

これまで北日本を中心に行ってきた赤かび病の発生実態を全国規模で明らかにするとともに関与する菌種を同定する。特にムギ栽培地域ではムギでの菌種と比較し、ムギ類赤かび病の発生における、伝染環としてのイネの重要度を明らかにする。イネ品種の違いによる赤かび病の感受性および毒素蓄積量におけるイネ品種間差異を明らかにし、イネの毒素蓄積回避技術確立のための基礎的知見とする。病原菌、栽培条件および収穫後の乾燥条件が毒素蓄積に及ぼす影響を明らかにし、イネの毒素蓄積回避技術確立のための基礎的知見とする。

カ　要　約

イネに発生する赤かび病菌の発生実態を把握するため北日本5県の圃場を調査したところ、いずれの県においても赤かび病の発生を確認するとともにその原因となる菌の多くが NIV 産生型の *F. asiaticum* であることを明らかにした。イネから分離した *F.graminearum* 複合種を用いて圃場およびポット試験において接種試験を行った結果、病徴を再現することに成功し、出穂始めから出穂期が感染に好適な時期であることを明らかにした。立毛時に被害の認められたイネ（あきたこまち）の玄米には必ずしも毒素が蓄積していないことを明らかにするとともに、栽培条件や収穫後の乾燥条件が被害に大きく影響することを明らかにした。北日本の主要品種について接種試験を行った結果、立毛時の被害程度に品種間差異が認められ、品種によりかび毒の蓄積に違いがある可能性が示唆された。

キ　引用文献

Bluhm B. H., Flaherty J. E., Cousin M. A., and Woloshunk C. P. 2002. Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene-and fumonisin producing species of *Fusarium* in Cornmeal. J. Food. Prot. 65: 1955-1961.

研究担当者（藤　晋一*、古屋廣光、内藤秀樹）

8　東日本におけるコムギ赤かび病のかび毒汚染リスク低減化技術の開発

ア　研究目的

赤かび病は、作物の収量を大きく低下させる重要病害であるが、それ以上に、感染組織に人畜に有害なかび毒であるニバレノールやデオキシニバレノールを蓄積するため大きな問題となっている。そして、コムギには高度赤かび病抵抗性を持つ実用品種がなく、本病の防除は農薬散布に依存しているが、最適な赤かび病防除薬剤およびその散布適期について情報が少ないのが現状であった。また、地域によって赤かび病の発生状況およびコムギ栽培品種に違いが見られることから、地域ごとに赤かび病防除技術を検討する必要があった。そこで、本課題では東日本地域における主要コムギ品種を利用した薬剤による赤かび病防除技術の開発に主眼を起き、各種薬剤の赤かび病防除に対する予防効果と治療効果、ならびに赤かび病菌のコムギ穂への感染時期と被害程度・かび毒蓄積量との関係について検討した。さらに、東日本に分布するムギ類赤かび菌のかび毒産生性について解析を行った。

イ　研究方法

(ア) 各種薬剤の赤かび病防除に対する予防効果と治療効果

茨城県谷和原村（現つくばみらい市）の中央農研水田圃場でコムギ品種「農林61号」を用いて本試験を行った。開花4日後に赤かび病菌（*F. graminearum*、H3菌株）の分生子懸濁液（濃度5x10^5個/mL）を噴霧接種（100Ｌ/10a）した。薬剤として、テブコナゾール水和剤、アゾキシストロビン水和剤、チオファネートメチル水和剤、メトコナゾール乳剤を供試し、接種4日前（予防効果を検証するための試験）および接種6日後（治療効果を検証するための試験）にそれぞれの薬剤の散布を行った（散布量：150L/10a）。

発病促進のための散水は行わなかった。接種20日後に発病調査（発病穂率、罹病程度、各区100穂）を行った。コムギを収穫後2.2mm 縦目振とう篩にかけて得られた整粒の外観被害粒率および DON・NIV 含量を調査した。かび毒の分析は KM アッセイセンターに依頼し、エライザ法により分析を行った。

(ｲ) 赤かび病菌感染時期による外観被害粒率とかび毒蓄積量への影響

温室内のワグネルポット（1/5000a サイズ）で栽培したコムギ品種「あやひかり」を用いて本試験を行った。開花期、開花１、２、３、４および５週間後に赤かび病菌（*F. graminearum*、H3菌株）の分生子懸濁液（濃度5x10^{5}個/mL）を噴霧接種（30 mL/ポット）した。湿度100％温度25℃の接種装置内で24時間静置後、５日間散水処理を行った。コムギを収穫後、2.2 mm 縦目振とう篩にかけて得られた整粒の外観被害粒率およびDON含量をエライザ法により調査した。

(ｳ) 登熟後期感染における２回目薬剤散布時期と防除効果・かび毒蓄積量との関係

つくば市観音台の中央農研畑圃場でコムギ品種「農林61号」を用いて本試験を行った。薬剤として、チオファネートメチル水和剤およびメトコナゾール乳剤を用いた。コムギの開花期に第１回目の薬剤を散布（散布量：150L/10a）し、２回目薬剤散布を行わない区、開花７日後、開花12日後、開花17日後に２回目農薬散布を行う区の計４実験区を設けた。接種直前に各実験区からコムギ穂を採取し、穂での薬剤残留量を調査した。残留量分析は株式会社クレハに依頼した。開花21日後に赤かび病菌（*F. graminearum*、H3菌株）の分生子懸濁液（濃度5x10^{5}個/mL）を噴霧接種（100L/10a）し、その後、散水により発病を促進させた。収穫後、2.2 mm 縦目振とう篩いによって得られたコムギ整粒について、DON 含量（エライザ法）および外観健全整粒に含まれる赤かび病罹病粒率を調査した。

(ｴ) 東日本地域に分布するムギ類赤かび病菌のかび毒産生性

東日本地域の16県から157個の赤かび病罹病標本を各県の協力を得て採集し、各標本に含まれるスポロドキアから単胞子分離を行い、その胞子形態および分離菌株の菌叢状態から菌種の簡易同定を行った。分離同定した菌株のうち112菌株を米培地で培養（25℃２週間）し、かび毒生産性（DON、NIV、ゼアラレノン＜ZEA＞）の調査を行った。かび毒の分析は、マイコトキシン協会に依頼し、LC-MS、GC-MS 併用法（検出限界0.05 ppm）で行った。

ウ　研究結果

(ｱ) 各種薬剤の赤かび病防除に対する予防効果と治療効果

赤かび病菌の接種４日前に薬剤を散布した場合、テブコナゾール水和剤、チオファネートメチル水和剤およびメトコナゾール乳剤処理区では無処理区に比べ赤かび病の発病およびDON含量が抑制されたが、アゾキシストロビン水和剤処理区では、無処理区と比べそれらの抑制効果はほとんどみられなかった（表2508-1）。一方、接種６日後に薬剤を散布した場合、テブコナゾール水和剤、チオファネートメチル水和剤およびメトコナゾール乳剤処理区では無処理区に比べ赤かび病の発病及びDON含量が抑制されたが、アゾキシストロビン水和剤処理区での赤かび病の発病および DON 含量は、無処理区とほとんど変わらなかった（表2508-2）。なお、薬剤散布は、接種４日前に散布した方が接種６日後に散布する場合に比べ効果が高かった。

表2508-1　各種薬剤の予防散布による赤かび病被害とかび毒蓄積抑制

薬　剤　名	倍率	発病穂率(%)	罹病程度	被害粒率(%)	DON(ppm)
テブコナゾール	2,000	19.0	1.1	2.8	1.00
アゾキシストロビン	2,000	43.7	4.2	9.7	5.20
チオファネートメチル	1,000	20.0	2.1	3.4	0.40
メトコナゾール	1,000	22.7	1.5	3.8	0.70
無 処 理		44.3	4.4	10.1	6.8

表2508-2　各種薬剤の治療散布による赤かび病被害とかび毒蓄積抑制

薬　剤　名	倍率	発病穂率(%)	罹病程度	被害粒率(%)	DON(ppm)
テブコナゾール	2,000	39.0	3.3	6.2	2.70
アゾキシストロビン	2,000	57.3	6.0	11.3	8.40
チオファネートメチル	1,000	34.7	3.4	5.5	1.70
メトコナゾール	1,000	45.7	3.4	6.8	4.60
無 処 理		72.0	7.9	13.7	7.6

(ｲ) 赤かび病菌感染時期による外観被害粒率とかび毒蓄積量への影響

赤かび病被害粒率は、開花１、２および５週間後接種区で、DON 含量は開花１週間後接種区で最も高くなった（図2508-1)。また、開花３週間後に接種した場合でも開花期接種区の半分程度までDONがコムギ整粒中に蓄積していた。

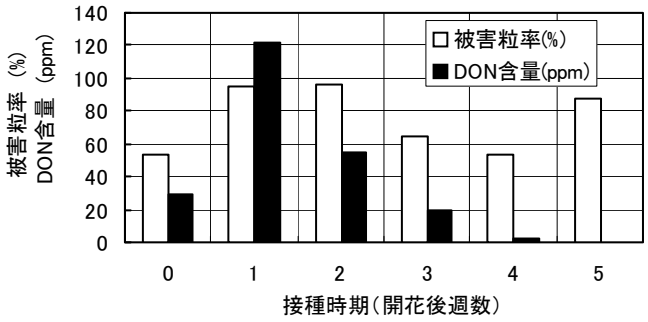


図2508-1　接種時期と赤かび病被害およびかび毒蓄積

(ｳ) 登熟後期感染における２回目薬剤散布時期と防除効果・かび毒蓄積量との関係

メトコナゾール乳剤散布区では、１回散布区に比べ、開花12日および同17日後散布区で外観健全粒に含まれる赤かび病罹病粒率、DON 含量が最も低くなった（図2508-2)。また、開花21日後（接種直前）のメトコナゾール残留量も開花12日および同17日後散布区で最も多くなった。一方、チオファネートメチル水和剤散布区では、開花７日後散布区で外観健全粒に含まれる赤かび病罹病粒率、DON 含量が最も低くなった（図2508-2)。また、開花21日後（接種直前）のチオファネートメチル残留量は、開花17日後散布区が最も多く、薬剤散布が開花期に近づくほど少なくなった。

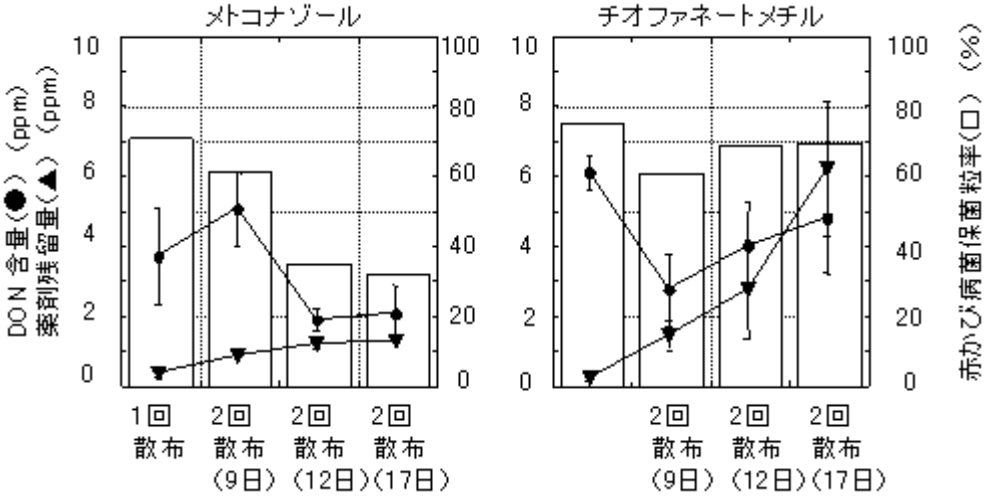


図2508-2　後期感染前の２回目薬剤散布時期とコムギ粒のかび毒含量・保菌粒率・薬剤残留量

1）横軸括弧内は２回目薬剤散布を行ったコムギの開花後日数を示す

(ｴ) 東日本地域に分布するムギ類赤かび病菌のかび毒産生性

単胞子分離した390菌株は、その胞子形態などから368菌株が *F. graminearum*、14菌株が *Microdochium nivale*（新潟県 7 菌株、福井県 7 菌株）、4菌株が *F. avenaceum*（福島県 4 菌株）、1 菌株が *F. equiseti*（宮城県 1 菌株）、3 菌株が *F.* spp（宮城県 1 菌株、山形県2菌株）にそれぞれ分類された。114菌株についてかび毒産生性（DON、NIV、ZEA）を調べたところ、*F. graminearum* のみがかび毒を産生し、そのうち53%の菌株が NIV のみを産生し、35%の菌株が DON のみを産生し、11%の菌株が DON/NIV 両方を産生し、2 %の菌株が ZEA を産生し、かび毒非産生菌株は 1 菌株のみであった（表2508-3）。

エ 考 察

(ｱ) 各種薬剤の赤かび病防除に対する予防効果と治療効果

薬剤による病害防除試験を行う場合、病原菌の接種前に薬剤を散布しその防除効果（予防効果）を検討する事例が多い。しかし、圃場では、薬剤散布前に病原菌の作物への感染が生じる場合もあり、病原菌感染後に薬剤を散布した場合の防除効果（治療効果）を検討することは重要である。そこで、4 つの薬剤に関して、赤かび病防除に対する予防効果および治療効果を検討した。その結果、テブコナゾール水和剤、チオファネートメチル水和剤およびメトコナゾール乳剤は、予防効果、治療効果ともにあることがわかり、赤かび病の感染前および後に薬剤の散布を行っても、赤かび病の感染・増殖を抑制するとともに、かび毒の蓄積も抑制可能であることが示された。また、赤かび病防除には予防効果が治療効果より高いことから、コムギの開花期に散布するなど感染前に防除することが最も効果的である。しかし、アゾキシストロビン水和剤に関しては、赤かび病防除に対する予防効果と同時に治療効果も極めて低く、赤かび病菌の感染後に散布しても効果が期待できないことが示唆された。

表2508-3 各県の麦類赤かび病罹病標本から分離された *Fusarium graminearum* のかび毒産生性

県	DON	NIV	DON+NIV	ZEA	非検出
青森	7		3		
宮城	8	10			
福島	5	6	4	1	
山形		3	1		
長野	7	1	2		
静岡	1	3			
千葉	3	3			
栃木		2			
茨城	1	4	1		
埼玉		3			
三重	1	4			
岐阜	1	4			1
愛知	2	3		1	
富山		5			
福井		4			
合計	36	55	11	2	1
割合(%)	35.0	53.4	10.7	1.9	1.0

(ｲ) 赤かび病菌感染時期による外観被害粒率とかび毒蓄積量への影響

赤かび病菌が感染するコムギ穂の登熟段階の違いと被害との関係に関して不明な点が多かった。本試験から、コムギ整粒の外観被害粒率および DON 濃度を比較した場合、赤かび病による被害は開花期感染の場合で必ずしも高くなるわけではなく、開花 1 ～ 2 週間後で高くなることがわかった。開花期感染の場合、不稔等により種子形成が強く阻害されて整粒が少なくなり、結果的に外観被害粒率が低下したと考

えられる。そのため本試験で得られた知見はコムギ穂の赤かび病に対する感受性を必ずしも表しているものではない。しかし、収穫物（整粒）に対する赤かび病被害を抑制するための防除時期を考えた場合には、本試験で得られた知見から、開花期以降の防除も重要であることを示している。また、赤かび病菌による被害（外観被害粒率）とDON蓄積量の間には必ずしも相関があるわけではなく、登熟後期（開花3～5週間後）に赤かび病菌を接種した場合、被害粒率が贈加する一方でDON蓄積量は減少した。しかし、開花3週間後に接種した場合でも、DONが開花期接種の半分程度まで蓄積していることから、登熟後期での赤かび病菌感染も防除する必要があると考えられた。なお、赤かび病菌の感染時期とかび毒蓄積量との関係については、赤かび病抵抗性の異なるコムギ品種・系統を用いてより詳細に解析する必要がある。

(ｳ) 登熟後期感染における2回目薬剤散布時期と防除効果・かび毒蓄積量との関係　前項の試験により、赤かび病菌の登熟後期感染による被害及びDON蓄積が無視できないことから、赤かび病菌の登熟後期（開花21日後）接種条件下での防除薬剤の2回目散布適期について検討した。2回目薬剤散布時期が接種時期に近づくとともにコムギ穂のメトコナゾール及びチオファネートメチル残留量が増加し、開花17日後（接種4日前）に散布した実験区では、接種直前のコムギ穂にメトコナゾール乳剤散布区で1.2ppm、チオファネートメチル水和剤散布区で6 ppm 以上の薬剤が残留していた。メトコナゾール乳剤散布区ではコムギ穂での残留量に比例する形で赤かび病防除効果・かび毒含量抑制効果があらわれたのに対し、チオファネートメチル水和剤では、残留量の増加が防除効果・かび毒含量の抑制につながらなかった。作物に含まれる薬剤残留量と防除効果・かび毒含量の抑制効果との関係については報告例が少ない。本結果は残留量の多さが防除効果に結びつかないこともあることを示している。ただ、本試験は単年度の圃場を利用した結果であり、栽培環境に強く影響を受けることから、複数年試験を行うことによりデータの信頼度を上げる必要がある。

(ｴ) 東日本地域に分布するムギ類赤かび病菌のかび毒産生性

東日本各地域で発生するムギの赤かび病原因菌は主に *F. graminearum* であることが明らかとなった。赤かび病菌のかび毒素毒産生能は地域により偏りがみられ、DON産生菌は東北地域で多く分布し、関東東山、東海、北陸地域の順に少なくなる傾向がある一方、NIV産生菌は北陸及び東海地域で多く分布していた。北海道ではDON産生菌が多く分布し（相馬2004）、西日本地域でNIV産生菌が多区分布することが明らかとされていることから（吉田ら　2003）、緯度又は気温等の気象条件がDON産生菌とNIV産生菌の分布に影響しているのかもしれない。

オ　今後の課題

圃場試験及びポット試験ともに野外の環境に強く影響を受けることから、複数年の実験を行いデータの信頼性を高める必要がある。

カ　要　約

テブコナゾール水和剤、チオファネートメチル水和剤、イミノクタジン酢酸塩液剤およびメトコナゾール乳剤は、赤かび病による被害及びかび毒蓄積を抑制する効果がみられる一方、アゾキシストロビン水和剤は抑制効果がみられなかった。また、テブコナゾール水和剤、チオファネートメチル水和剤およびメトコナゾール乳剤は赤かび病防除に関して予防効果とともに治療効果も認められた。一方、アゾキシストロビン水和剤には予防・治療効果ともに認められなかった。そして、メトコナゾール乳剤はチオファネートメチル水和剤とテブコナゾール水和剤に比べ耐雨性が高いことがわかった。赤かび病菌のコムギ穂登熟後期（開花21日後）感染では、メトコナゾール水和剤の2回目散布を開花12日後以降に行うことで、防除効果とかび毒蓄積抑制効果が得られる。東日本地域に分布する赤かび病菌はそのほとんどが *F. graminearum* であり、東北地方ではDON産生菌が多く、西日本地域に近づくほどNIV産生菌の割合が増える傾向があった。

キ　引用文献

Ban, T. and Suenaga, K. 2000. Genetic analysis of Fusarium head blight caused by Fusarium graminearum in chinease wheat cultivar Sumai 3 and the Japanese cultivar Saikai 165. Euphytica. 113:87-99.

中島隆　2004.　ムギ類赤かび病とマイコトキシン汚染の薬剤防除.　植物防疫.　58:167-171.

相馬潤・角野晶大　2003.　2001―2002年における北海道の春まきコムギから分離された赤かび病菌の

デオキシニバレノール産生能．　北日本病害虫研報．54:38-40.

吉田めぐみら　2003.　西日本に分布する麦類赤かび病菌のマイコトキシン産生能とニバレノール産生菌の病原力．　日植病報．70:27.

吉松英明ら　2005　チオファネートメチル剤耐性*Fusarium graminearum*の初発生　2005赤かび病研究会講演要旨集．　8.

研究担当者（宮坂篤、小泉信三、川上顕*）

9　東海地方における麦類のマイコトキシン汚染防止技術の開発

ア　研究目的

近年、水田転作作物としての小麦の作付けは定着してきたが、安全志向等から低価格、高品質で安全な麦が求められている。このため、生産現場では品質向上とかび毒汚染の防止が重要な課題となっている。これに対応した技術開発が進められているが、赤かび病の省力、低コストの効率的な防除法はことに強く求められている。これに対応し、かび毒汚染リスクを低減する安価で効果的な方法を緊急に開発する。

イ　研究方法

(ｱ) 第1次伝染源を除去する耕種的防除技術の開発

a　水稲刈株除去による赤かび病の耕種的防除

赤かび病の第1次伝染源は、稲株やイネ科雑草に形成される子のう殻である[1, 2]。労力面から行われていないが、稲株の土中埋め込みや除去等は、伝染源を減らす有効な方法と考えられる。出穂前の稲わらの除去により、コムギ赤かび病が耕種的にどの程度防除できるか、場内水田転換畑（品種：農林61号）で試験した。発病調査は、2004年5月30日に各区100穂について行い、発病穂率、発病小穂率を算出した。また、かび毒について、エライザ法により、DON, NIVの量を測定した（外部委託）。

b　播種時稲わらすき込みによる赤かび病の耕種的防除

播種時のアップカットロータリ耕による稲わらすき込みにより、コムギ赤かび病が耕種的にどの程度防除できるか現地ほ場で調査した。実施場所は、東三河地域の2地区（品種：農林61号）で、共に隣接の一般ほ場と比較した。発病調査は、2004年5月19日に各区100穂について行い、発病穂率，発病小穂率を算出した。各区ともチオファネートメチル水和剤で開花期から乳熟期の間に1回防除した。

(ｲ) 地域の実情に適合した作業分散可能な抵抗性品種の選定

かび毒汚染リスクを低減する最も安価な方法は、地域の実情に適合した作業分散可能な赤かび病に強い品種の作付けである。普及を目指している有望品種及び本県育成の有望系統等のほ場における赤かび病抵抗性程度を調査した。

麦粒培地で28℃、7日間培養した赤かび病菌を、2004年4月11日に10ａ当たり25kg 条間に散布した。また、ＣＭＣ培養液で28℃，5日間培養した赤かび病菌の胞子懸濁液（1.0×10^5個／ml）を2004年5月2日に10ａ当たり50リットル接種し、発病を促した。

発病調査は、2004年5月18日に各区100穂について行い、発病穂率及び発病小穂率を算出した。また、かび毒について、エライザ法により、DON，NIV の量を測定した（外部委託）。

(ｳ) 施用法改善による効率的防除法の開発

赤かび病は、発生が天候に大きく左右されて年次間差が大きいこと、防除適期が短いことなどから的確な防除が難しいため、大面積を短期間で防除できる技術が求められている。そこで、薬液調製や散布時間の短縮が見込まれるブームスプレーヤ及びラジコンヘリを用いた農薬少量散布によるコムギ赤かび病の防除効果を検討した。

a　ブームスプレーヤを用いた少量散布による効率的防除法の開発

少量散布は、通常散布の散布濃度の4倍濃度の薬液を4分の1量散布する方法（散布有効成分量は同じ）とし、2004年4月25日（開花盛期）に試験用手散布ノズルを用い、背負式動力噴霧機で散布した。麦粒培地で28℃，7日間培養した赤かび病菌を、2004年4月11日に10ａ当たり20 kg 条間に散布し、発病を促した。発病調査は、2004年5月24日に各区100穂について行い、発病穂率及び発病小穂率を算出した。また、かび毒について、エライザ法により、DON, NIVの量を測定した（外部委託）。

b　ラジコンヘリ利用による効率的防除法の開発

事業開始時には、ラジコンヘリで散布できる赤か

び病に農薬登録のある薬剤は、チオファネートメチル水和剤のみであったため、剤の選択の余地がなかった。このため、作用機作の異なる剤の農薬登録が強く望まれていた。そこで、地上散布で赤かび病に農薬登録のある剤を供試し、コムギ赤かび病の防除効果（自然発病条件）を現地ほ場で調査した。

使用したラジコンヘリの機種はヤマハ発動機株式会社のＲ50で、2004年４月30日（開花終期）に安城市の現地ほ場で散布を行った。発病調査は、2004年５月18日に各区100穂について行い、発病穂率及び発病小穂率を算出した。また、かび毒について、エライザ法により、DON, NIV の量を測定した（外部委託）。

(ｴ) 耕種的防除法を組み入れた効率的防除体系の確立・導入

耕種的防除法を組み入れた効率的防除体系として、品種は農林61号、耕種的防除法として稲わらの除去を行い、化学的防除法としてブームスプレーヤを用いた農薬少量散布（プロピコナゾール乳剤250倍 25ℓ／10ａ）を行う体系を組んで、その効果を検討した。

稲わらの除去は、４月中旬の穂ばらみ期までに行い、薬剤散布は2004年５月５日（開花盛期）に試験用手散布ノズルを用い、背負式動力噴霧機で行った。発病調査は、2004年５月30日に各区100穂について行い、発病穂率及び発病小穂率を算出した。また、かび毒について、エライザ法により、DON, NIV の量を測定した（外部委託）。

ウ　研究結果

(ｱ) 第１次伝染源を除去する耕種的防除技術の開発

2003年に周辺に伝染源の少ないと思われる畑で、稲株を埋め込んで調査したところ、稲株区で赤かび病の発病が明らかに増加した。2004年には水田転換畑において、稲わらの除去が有効な耕種的防除法となるかどうかの確認を行った結果、出穂前までの稲わら除去により、コムギ赤かび病の発病は明らかに低下した（表2509-1）。また、現地調査の結果、播種時のアップカットロータリ耕による稲わらすき込みにより、本病の発病が減少することが明らかとなった（表2509-2）。この結果から、ほ場に残された稲わらが重要な第１次伝染源であることが再確認できた。かび毒については、DON は検出限界以下であったが、NIV は稲わら除去区の方が濃度が低かった（表2509-1）。

表2509-1　稲わらの有無と赤かび病の発病

稲わらの有無	発病穂率	発病小穂率	ＤＯＮ量	ＮＩＶ量
あ　り	34%	7.2%	N.D.	0.44ppm
な　し	17	2.4	N.D.	0.17

表2509-2　播種時稲わらすき込みの有無と赤かび病の発病（2004）

地区	耕起方法	発病穂率	発病小穂率
Ａ地区	アップカットロータリ耕	5%	0.4%
	ロータリ耕（慣行）	13	1.3
Ｂ地区	アップカットロータリ耕	10	1.1
	ロータリ耕（慣行）	29	2.5

アップカットロータリ耕：稲わらすき込み
各区ともチオファネートメチル水和剤で１回防除（開花期以降）

(ｲ) 地域の実情に適合した作業分散可能な抵抗性品種の選定

当場育成系統の多くは農林61号と同程度の発病を示し、抵抗性やや強と考えられた（表2509-3)。抵抗性が弱の農林12号及び Gamenya は発病程度が高かった。

かび毒調査の結果、基準値（1.1 ppm）を遥かに越えたのは、Gamenya 及び農林12号で、発病程度と同傾向であった。西海186号は、発病は比較的少なかったが、基準値をわずかに超えていた。後期感染により病粒の混入率が高まった可能性がある。農林61号より 3 日早熟のイワイノダイチは、かび毒量、発病程度とも農林61号と同程度（表2509-3）であったので、これを有望品種として選定した。

表2509-3　有望品種・系統の赤かび病抵抗性ほ場検定結果

品種・系統名	発病穂率	発病小穂率	ＤＯＮ量	ＮＩＶ量
小13-1	8%	0.7%	0.32ppm	0.06ppm
小13-3	8	0.7	0.38	N.D.
小13-4	10	1.0	0.39	N.D.
小13-5	8	0.7	0.56	0.10
小13-6	8	0.7	0.82	0.07
愛系02-1	9	0.9	0.99	0.26
愛系02-2	15	1.3	0.44	0.10
西海186号	9	0.8	1.23	0.32
イワイノダイチ	6	0.5	0.31	0.14
きぬの波	6	0.5	0.55	0.12
ニシノカオリ	19	1.8	0.66	0.17
東山40号	8	1.3	0.59	0.12
農林12号	89	23.8	13.50	1.42
Gamenya	69	12.9	28.00	2.80
農林61号	6	0.5	0.48	0.09

(ｳ) 施用法改善による効率的防除法の開発

a　ブームスプレーヤを用いた少量散布による効率的防除法の開発

供試薬剤は各剤とも対照のチオファネートメチル水和剤と同等以上の防除効果を示し、実用的であることがわかった(図2509-1)。かび毒調査の結果、DON はすべての処理で検出限界以下であった。また、NIV もわずかに検出されただけであった。後期感染が少なかったため、赤かび粒の混入率が低く、汚染程度が少なかったものと推測された。

b　ラジコンヘリ利用による効率的防除法の開発

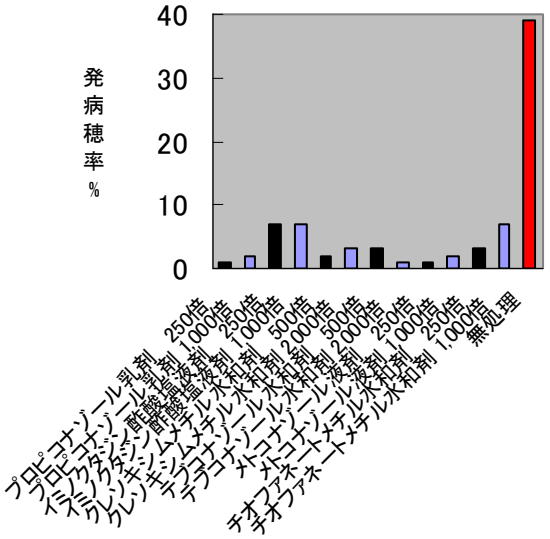
供試薬剤は各剤とも対照のチオファネートメチル水和剤 4 倍の10 a 当たり800ml 散布と同等以上の防除効果を示し、実用的であることがわかった（図2509-2)。

かび毒調査の結果、DON はすべての処理で検出限界以下であった。NIV は検出されたが、各処理とも無処理と差がないと考えられた。

(ｴ) 耕種的防除法を組み入れた効率的防除体系の確立・導入

体系区は薬剤区とほぼ同等の防除効果であり、稲わら除去の効果が判然としなかった（表2509-4)。これは、赤かび病に対する薬剤の防除効果が高かったためと思われた。

かび毒調査の結果、DON はすべての処理で検出限界以下であった。NIV 量は全般に少なかったが、稲わら除去とプロピコナゾール乳剤少量散布の組み合わせで、無処理に比べて量の低下が認められた（表2509-4)。



少量散布： 250倍又は 500倍　25 L/10a
通常散布：1000倍又は2000倍 100 L/10a

図2509-1　ブームスプレーヤ散布による防除効果

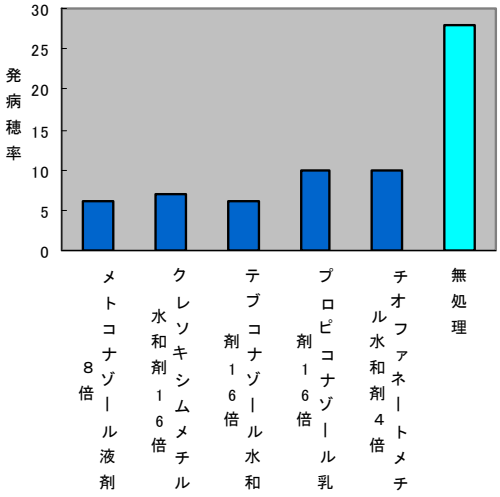


図2509-2　ラジコンヘリ散布による防除効果

表2509-4　耕種的防除法を組み入れた防除体系による赤かび病の防除効果

処　理　方　法	発病穂率	発病小穂率	ＤＯＮ量	ＮＩＶ量
稲わらの除去＋プロピコナゾール乳剤 250倍　25ℓ／10ａ	4%	0.3%	N.D.	0.10ppm
プロピコナゾール乳剤 250倍　25ℓ／10ａ	4	0.4	N.D.	0.23
無　処　理	34	7.2	N.D.	0.44

エ　考　察

稲株の埋め込み等による除去が有効であることが明らかとなったが、第１次伝染源となる子のう殻形成が確認されているイネ科雑草による影響がどの程度かは不明である。第１次伝染源の減少を図るためには、畦畔等の雑草管理も考慮に入れた対応が必要と考えられた。また、薬剤防除を適期に行うと、その効果は非常に高く、耕種的防除として取り入れた稲株の埋め込みの効果が実質的には出てこないなど、技術の組合せにおける難しさが明らかとなった。

地域の実情に適合した作業分散可能な抵抗性品種として、農林61号よりやや早熟で抵抗性程度がほぼ同等のイワイノダイチが有望であったので、これを選定した。しかし、多発生下での検討ができなかったので、この点は更に試験の必要がある。また、農林61号より出穂期がやや早いため、普及段階で、感染時期の気象条件が異なることによる発病の違いが、品種の抵抗性の違いと誤解されるおそれがある。普及段階で十分な啓発を図る必要がある。

ブームスプレーヤを用いた少量散布法では、供試薬剤は各剤とも有効であることが明らかとなったが、ほ場での省力性、薬量の削減等についての検討を今後進める必要がある。また、現場で使用するためには、この方法での農薬登録が必要であるため、さらに事例を積み重ね、登録に結びつけていくことが重要と考える。

ラジコンヘリ利用による農薬少量散布は、現在、基幹技術として現場に定着してきているが、薬剤の選択肢が少ないため、耐性菌の出現を危惧しながら防除を行っているのが実態である。このため、有効薬剤については早急に農薬登録を進める必要があるが、現場での試験では、被害補償の面から病原菌の

接種が困難なため、十分な発病条件の試験の実施が難しいという問題点がある。円滑な農薬登録のために、何らかの行政的支援が必要と考えられる。

オ　今後の課題

経営面積の拡大により防除作業が集中し、適期防除が困難になっているため、作業分散可能な新たな防除法が求められている。出穂前から対応できるような方法、例えば、誘導抵抗性の発現、拮抗微生物等の研究開発を進めていく必要がある。

カントリーエレベータ搬入時にできるかび毒汚染麦の簡易な判別方法が強く求められている。これに対応した技術開発を進めていく必要がある。

カ　要　約

稲株の除去が耕種的防除法として有効であることを明らかにしたが、農薬による適期防除と組み合わせると、農薬の防除効果が高いためにその効果の程度が判然ととしなかった。農林61号と作業分散可能な抵抗性品種として、3日早熟のイワイノダイチを選定した（2004年に愛知県の奨励品種として採用）。ブームスプレーヤ及びラジコンヘリによる少量散布は、各剤とも高い防除効果が認められ、省力防除法として有効であった。しかし、現場での使用には農薬登録が必要であり、今後更なる試験が必要である。

キ　引用文献

１）　石井・柏木弥太郎 1953a. 麦類アカカビ病の一次伝染源としての稲株. 農業技術. 8（10）:32-33.

２）　石井・柏木弥太郎 1953b. 麦類アカカビ病の第一次伝染と稲株並に防除に関する一私見. 日植病報. 18:89.

研究担当者（加藤順久*）

10　西日本における赤かび病菌の個体群動態の解明と生態的制御技術の開発

ア　研究目的

かび毒による健康リスクを総合的に低減・管理する手法として農産物の生産段階における工程管理によるGAP（Good Agricultural Practice:適正農業規範）の導入が進められている。GAP策定のためにはリスク低減に有効な生産管理手法の裏付けとなる科学的根拠が必要となる。そのためには、赤かび病菌の伝染環等の疫学的知見が必要である。ムギ類赤かび病の圃場内における個体群の遺伝的背景や、毒素産生能の差異、適応力等に関する多様性は不明である。このため、我が国の赤かび病伝染環は、作物残渣を中心とした想定部分が多く、伝染源の量的評価も不十分である。これらを明らかにするためDNAマーカー等を活用した分子生態学的研究を行った。本研究では、自然発病圃場よりサンプリングしたムギ類赤かび病菌個体群の多様性と分布様式を調査し、時間の経過とともにその分布様式がどのように変動するかを検討した。分布様式を明らかにすることは、病原菌の移入および圃場内での感染拡大のメカニズムを知る上で重要な情報源となる。Codexの赤かび病かび毒に関する報告書では麦類以外の穀物、特に米の汚染も問題としている．このため、赤かび病菌の特性から風水害や病害虫等の被害が誘因となり、米のかび毒汚染リスクが高くなるとの仮説を設定し、汚染実態の調査を行った。

イ　研究方法

(ｱ) 赤かび病菌の個体群動態の解明

a　圃場内の赤かび病菌の多様性

九州沖縄農研内の自然発生圃場において発病の空間分布調査を行った。圃場内20カ所から収穫したコムギ粒のDON、NIV濃度を測定し、同一圃場内の毒素分布のバラツキを調べた。さらに各地点から単胞子分離した菌株の毒素産生能の多様性を評価した。Suga et al (2004) の開発したマイクロサテライトマーカーを用いて上記圃場から分離した20菌株および他の自然発生圃場2カ所のそれぞれ50菌株について遺伝的多様性を評価した。

b　赤かび病発病穂の圃場内の空間・時間分布

九州沖縄農業研究センター内の赤かび病自然発病圃場（5 a; 13 畦 x 50 m;チクゴイズミ）より分生胞子塊（スポロドキア）を形成した穂（発病穂）を5月9日より以降4日毎に計4回調査した。発病穂を個体とみなして区内の平均他個体数を算出した。これを用いてIδ（アイデルタ）指数（Morishita, 1959）を算出し、分布の集中度について検討した。

$$I_\delta = n\frac{\sum_{i=1}^{n} x_i(x_i-1)}{N(N-1)}$$

nはコドラート数、Nはある採集時の総個体数、xiはi番目のコドラートの個体数である。

なお、アイデルタ指数について有意差検定を行った。

(ｲ) かび毒汚染要因の解明に基づく生態的制御法

の開発

a　倒伏と赤かび病かび毒の関係解明

2002～2004年にかけて同一圃場内もしくは隣接した圃場で、倒伏部分と非倒伏部分からそれぞれ収穫したコムギおよびオオムギを全国から収集し、DONおよびNIVの汚染濃度をELISA法により測定した 。赤かび病菌の特定の菌株を均一に接種した圃場で人為的に倒伏させる介入試験を行い、収穫時の毒素汚染濃度と倒伏期間の関係を調べた。

b　イネのかび毒汚染要因の解明

赤かび病菌の特性から風水害や病害虫等の被害が誘因となり、米のかび毒汚染リスクが高くなるとの仮説を設定し、2003-2004年に倒伏、冷害、いもち等の病害による被害、斑点米カメムシ被害粒、飼料用イネ等全国から約150サンプルを収集し、ELISAおよび化学分析によりニバレノール（NIV)、デオキシニバレノール（DON）の検出を行った。

ウ　研究結果

(ア) 赤かび病菌の個体群動態の解明

a　圃場内の赤かび病菌の多様性

15年度に調査した圃場の発病穂はランダムに空間分布していた。九州沖縄農研圃場内の20カ所からサンプリングしたコムギ粒のマイコトキシン汚染量はDONで7.3倍、NIVで2.9倍の違いがあった。圃場内から単胞子分離した20菌株はDON，NIV産生型が混在し、各産生型菌株間の毒素産生能にはそれぞれ15.7倍，10.6倍の違いがあった。マイクロサテライトマーカーとして選抜した10組プライマーセットを用いると赤かび病菌の個体識別が可能であった。自然発生圃場3カ所から分離した赤かび病菌の各個体群はいずれも遺伝的多様性が極めて高いことが判明した。

b　赤かび病発病穂の圃場内の空間・時間分布

2002年にサンプリングした圃場では集中分布していることが明らかになり、2005年についても各調査時において集中分布（4回中3回）していた。興味深いことに、2005年の集中分布様式のデータから初期の集中点を中心に分布・拡大しているよりはむしろ、各調査時の個体群がそれぞれ集中点を形成していた。

(イ) かび毒汚染要因の解明に基づく生態的制御法の開発

a　倒伏と赤かび病かび毒の関係解明

かび毒濃度をELISA法により比較した結果では倒伏部分の汚染濃度が有意に高かった（図2510-1)。また、非倒伏区の汚染濃度が高い程、対応する倒伏区の汚染濃度の増加量が大きくなる傾向にあった（図2510-3)。2条オオムギの試料は非倒伏区の毒素汚染濃度が高かったこともあるが倒伏により2倍以上の汚染濃度になった事例が認められた。赤かび病菌の

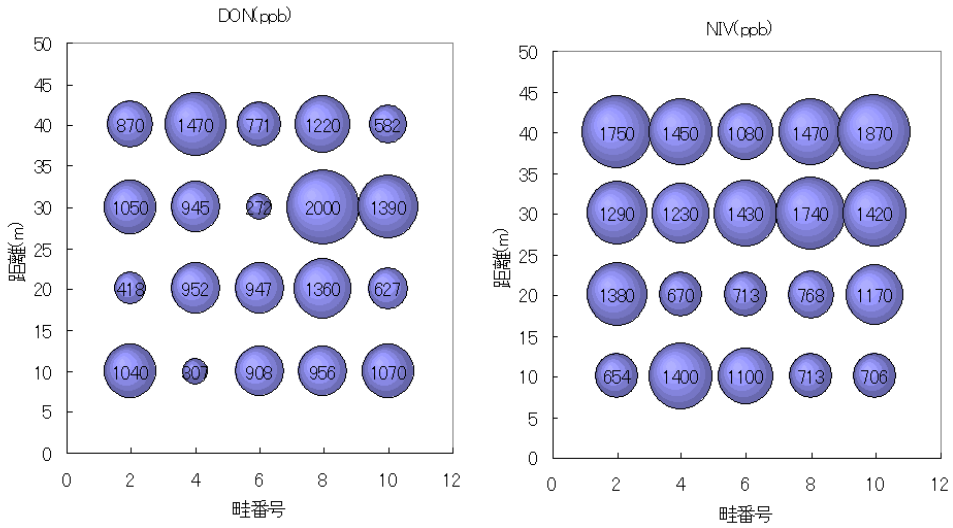


図2510-1　赤かび病自然発生圃場におけるコムギ試料かび毒汚染の空間分布

注：各試験区2 mを収穫し、脱穀後、2.2 mm篩で整粒とし、200 gを粉砕し、ELISA（協和メディックス）で分析

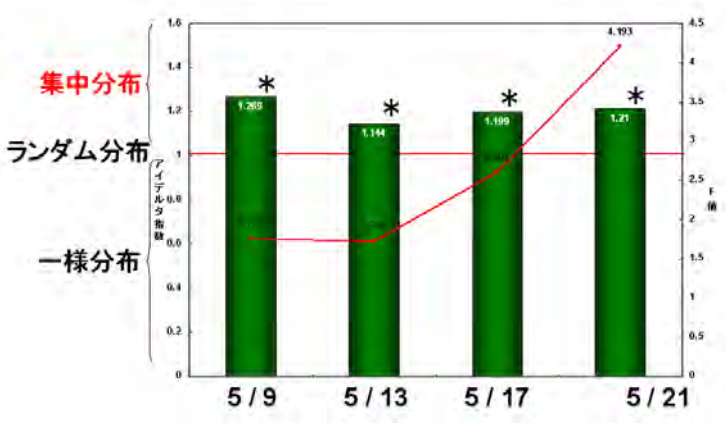


図2510-2　各調査時までの累積個体群のＩδ指数

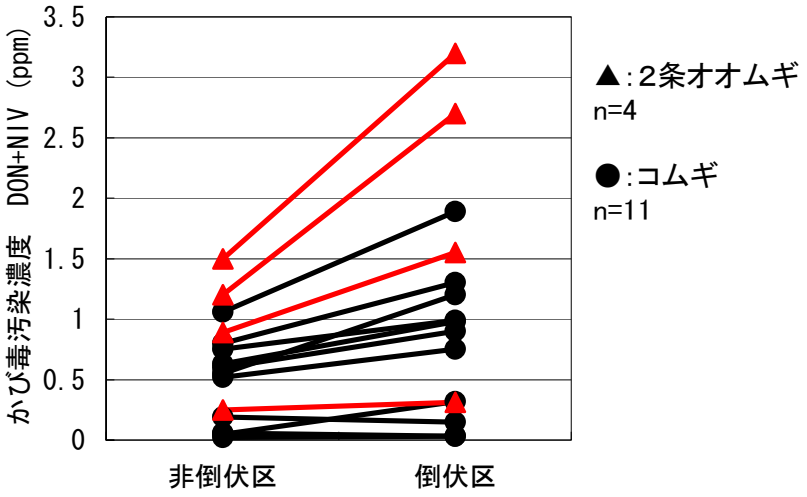


図2510-3　麦類赤かび病自然発病圃場におけるかび毒の汚染程度に及ぼす倒伏の影響
対応のあるｔ検定で有意差あり（P=0.0032）

特定の菌株を均一に接種した圃場で人為的に倒伏させる試験を行い、収穫時の毒素汚染濃度と倒伏期間の関係を調べた結果では、収穫前７～５日間の短期間の倒伏でも DON+NIV の値が30%程度増加した事例が複数認められた。倒伏期間が長くなるにしたがい汚染濃度が高くなる傾向があったが、その程度は試験事例で差が大きく、倒伏中の降雨の有無が大きく影響した。

b　イネのかび毒汚染要因の解明

斑点米カメムシ、飼料イネ（籾付き）、穂いもち、倒伏、障害型冷害、天日乾燥中の降雨の要因を受けた粗玄米からかび毒が検出された。DON よりも NIV の検出頻度が高く、NIV の汚染濃度は ELISA による測定値で0.10-0.44（汚染試料の平均：0.20）μg/g であった。化学分析でも同様の結果となり、ムギ類と比較して汚染程度は低かった。なお、上記要因を受けなかった約50試料からはかび毒が検出されなかった。汚染米粒からは高頻度で NIV 産生型 *Fusarium graminearum* が分離された。

表2510-1　要因別に採集したイネ試料（玄米）のかび毒汚染

要因	分析点数	検出	検出率 %	ELISAによるNIV汚染濃度（μg/g = ppm）
斑点米カメムシ	12	8	66.7%	0.44　0.16　(0.17)　(0.18)　0.20　0.30　0.20　0.11
飼料イネ（籾付き）	16	6	37.5%	0.12　0.30　0.41　0.13　0.18　0.17
障害不稔	7	2	28.6%	0.13　0.22
穂いもち	13	3	23.1%	0.19　0.19　0.19
倒伏	30	6	20.0%	0.39　0.17　0.10　0.10　0.12　0.10
掛け干し	10	2	20.0%	0.17　0.10　(0.113)
その他病害虫	14	0	0.0%	
対照区	50	0	0.0%	
合計	152	27	17.8%	汚染試料の平均濃度＝0.20μg/g

（ ）はDON汚染濃度

その他の病害虫：紋枯病（3）、籾枯細菌病（2）、稲こうじ病（1）、墨黒穂病（1）、ばか苗病（1）
トビイロウンカ（2）、コブノメイガ（1）、雀の食害（3）

エ　考　察

マイクロサテライトマーカーにおよる個体識別法は簡便な実験系で実施可能であり、今後の分子生態研究に利用できる。圃場内の空間分布の解析により、発病穂は有意に集中分布し、それぞれの採集時までの累積個体群の集中分布は、初期の集中点を中心に分布・拡大しているよりはむしろ、各調査時の個体群がそれぞれ集中点を形成していることが明らかとなった。このように集中度が増大せずに集中点が増えていくことから、分生胞子（無性生殖）による穂から穂への 2 次伝染の寄与度は低く、 1 次伝染源の子のう胞子（有性生殖）が長期間主要な感染源となることが示唆された。赤かび病菌が感染したムギでは、倒伏により、かび毒の子実汚染濃度が高くなることを疫学的に明らかにした。この成果は、かび毒汚染リスクを低減するために、①生育診断に基づく栽培管理（適切な追肥、土入れ等）による倒伏防止が重要である。②倒伏したムギに対して刈り分け等の対策を取るべきである。特に、赤かび病の発生が見られた圃場で倒伏した場合はかび毒汚染リスクが高い。等の指導を生産者に行う際の基礎データとして活用できる。倒伏区でのかび毒汚染濃度上昇に寄与する要因を解析したところ、全ての試験区で外観健全粒の汚染濃度が高いことから、外観健全粒に潜在感染していた赤かび病菌が倒伏により活性化し、マイコトキシンを産生したと推定された。イネの赤かび病かび毒汚染は倒伏、いもち・斑点米カメムシ多発等がなければ、検出限界以下であったことから、汚染リスクは麦類と比較して低く、上記要因を受けた米粒を選別・除去すること、および要因を受けない栽培管理手法を導入することでかび毒の汚染リスクを低減可能と推察された。

オ　今後の課題

自然発病圃場の毒素分布にバラツキが大きく、そこに存在する赤かび病菌の遺伝的多様性が高い事例が示されたが、サンプリングに必要な面積を決定するには事例を重ねる必要がある。倒伏防止はかび毒汚染低減のための GAP として重要あることが明らかになった。今後は、倒伏と収穫直前の降雨がかび毒蓄積に及ぼす影響を DON, NIV 以外のかび毒も含めて詳細に検討する必要がある。

カ　要　約

自然発生圃場の毒素汚染量は採集地点により DON で7.3倍、NIV で2.9倍の違いがあった。分離した赤かび病菌の各個体群は毒素産生型、産生能、遺伝的多様性が極めて高かった。赤かび病菌が感染したムギでは、倒伏により、本菌が産生するかび毒の子実汚染濃度が高くなった。斑点米カメムシ、飼料イネ（籾付き）、穂いもち、倒伏、障害型冷害、天日乾燥中の降雨の要因を受けた粗玄米からかび毒が検出された。

キ　引用文献

Morisita, M. （1959） Measuring of the dispersion

of individuals and analysis of the distributional patterns. mem. Fac. Sci., Kyushu Univ., Ser. E, 2:215-235.

Suga H, et al. (2004) Development of VNTR markers for two Fusarium graminearum clade species. Molecular Ecology Notes 4: 468-470.

研究担当者（中島隆*）

11　西日本における穀類赤かび病かび毒汚染リスク低減に有効な薬剤防除技術の開発

ア　研究目的

現在、麦類赤かび病に対して登録のある薬剤は赤かび病の被害を軽減することを目的に選抜され、残留毒性等の試験に合格したものが農薬取締法に基づく農薬登録を受け、実際の防除に使用されている。しかしながら、これら薬剤が DON、NIV 等のかび毒を軽減するか否かはほとんど明らかではない。したがって、既存の薬剤のかび毒低減効果を早急に評価する必要がある。また、赤かび病の発生は開花期前後の降雨量と関係が深い（石丸ら, 1970）。このため、多発時の防除は降雨の合間に行われることになる。降雨により本病が多発する要因として、伝染源である子のう胞子の飛散が多くなること（石井, 1961）、病原菌の感染・侵入には穂の濡れが必要なこと（Anderson, 1948）、これらに加え、散布された薬剤が降雨により流亡し、防除効果が低下することが考えられている（仲川ら, 1988）。このため、薬剤の耐雨性の評価が極めて重要である。赤かび病菌は麦類のみならずトウモロコシ、コメ、ダイズ等に寄生することが知られている。特に、コメは毒素産生に好適な基質とされており、厚生労働省の報告書にもコメのかび毒汚染の実態調査の必要性が明記されている。コメの赤かび病は病徴が不明瞭なため、目に見えない毒素汚染が拡がっている危険性がある。このため、本課題では防除技術の開発対象にコメも加えて対応した。

イ　研究方法

(ｱ) コムギ赤かび病防除薬剤のかび毒汚染低減防除技術の開発

a　薬剤のスクリーニング

圃場条件で栽培したコムギ品種「チクゴイズミ」を用いて、図2511-1に示す作用機作の異なる薬剤を供試した。開花始めとその 1 週間後に規定濃度に調整した薬剤を150ﾘｯﾄﾙ／10a 散布した。赤かび病菌（*Fusarium graminearum*）をマングビーン液体培地で25℃、5 日間振盪培養し、分生胞子を形成させた。培養液をガーゼで濾過し、2 ×10^5個/ml に胞子濃度を調整した。これを背負い式の噴霧器を用いて100ﾘｯﾄﾙ／10a 開花盛期とその 1 週間後に噴霧接種した。病原菌接種翌日から 2 日間感染を促すために 1 日 2 回鉄砲ノズルで 1 回当り300ﾘｯﾄﾙ／5 a 散水した。病原菌を培養したトウモロコシ粒を穂孕期に地表面に散布する接種法も併用した。接種には H3（DON 産生）菌株と NIV2（NIV 産生）菌株を等量混合して用いた。接種したコムギの発病調査は、開花20日後に行った。（なお、開花20日後以降は穂自体が登熟により黄色みを帯びてくるため病徴が見えにくくなった。）発病程度は、各穂について、発病して変色した面積に応じ 0 -100（0：病徴なし、5：1 小穂の一部が発病、10：1 小穂全体、または穂全体の10％までが発病、20-90：それぞれ穂全体の20-90％程度までが発病100：穂全体の95％以上が発病）で評価し、各処理区の平均値を算出した。収穫後、2.2 mm の粒厚で選別し、DON・NIV を（株）協和メデックス社の酵素抗体法（ELISA 法）により定量した。

b　耐雨性

2003年は 5 薬剤を2004年は10薬剤をそれぞれ供試した。両年とも薬剤散布は開花の 2 日後、約 8 割の小花が開花した時期に行った。水和剤には新グラミン3000倍を加用し、散布量は150L/10a になるように杓型噴霧器（安田工業：C 杓型）で散布した。粉剤は手回し式散粉機（丸山製作所：ベビーダスター）を用い4kg/10a となるように散布した。ゾル剤はエアーブラシ（オリンポス：ピースコン PC-WIDE308）を用いて0.8L/10a になるように散布した。1 処理区に2003年度は 4 ポット、2004年度は 3 ポットそれぞれ配置した。薬剤散布は野外で行い、降雨処理までは室内に置いた。降雨処理は九州沖縄農業研究センターの人工降雨実験施設で行った。強雨（5 ～100 mm ／時）室は高さ約14 m の位置から、弱雨（0 ～ 5 mm ／時）室は高さ 4 m から微細管雨滴形成の雨滴自由落下方式によって降雨を発生させた。薬剤散布23時間後に弱雨（3.6 mm/時× 3 時間）と強雨（25 mm/時× 2 時間）の 2 段階の降雨処理を同時進行で施した。なお、薬剤無散布のポットにも各降雨処理を施し、各試験の対照区とし、防除価の算出は各降雨処理を

施した薬剤無散布区の値を用いた。赤かび病菌（*Fusarium graminearum Schwabe*）をマングビーン液体培地で25℃，5日間振盪培養し、分生胞子を形成させた。培養液をガーゼで濾過し、5×10^5個/mlに胞子濃度を調整した。DON 産生型を1菌株（DON5）およびNIV産生型を1菌株（NIV1）別個に培養して、接種時に等量混合し、Tween 20を0.2 ml/l 加えて使用した。接種はエアーブラシ（オリンポス：ピースコンPC-WIDE308）を用いて1ポットあたり20ml噴霧した。接種は薬剤散布24時間後（2003年）と26時間後（2004年）に行った。両年とも接種後は細霧ハウス（15分間隔でミスト装置で1分間加湿）に1週間静置し、10日後に各ポットの発病穂率と罹病程度をBan and Suenaga（2000）の基準で調査し、発病度（Σ発病株率×罹病程度）を求めた。収穫後、粒厚選別は行わずにDON・NIVを（株）協和メデックス社の酵素抗体法（ELISA法）により定量した。

（ｲ）イネ赤かび病の発病とかび毒汚染低減防除技術の開発

ポット栽培した飼料イネ品種「スプライス」を用いて開花期に赤かび病菌を接種し、接種3日後に10種の薬剤（穂いもち・カメムシ防除剤）を散布し、10日後に発病調査を行い収穫後の毒素分析を行った。その他の方法は耐雨性試験と同様である。

ウ　研究結果

（ｱ）コムギ赤かび病防除薬剤のかび毒汚染低減防除技術の開発

a 薬剤のスクリーニング

メトコナゾール、テブコナゾール、キャプタン、チオファネートメチルが優れた赤かび病抑制効果を示し、マイコトキシンも有意に減少させた（図2511-1）。アゾキシストロビンは農薬登録があり、発病を抑制する効果はある程度認められる（防除価36.9～62.3）が、DON、NIVを増加させた。有機銅、無機銅、亜リン酸肥料は1試験事例のデータしかないがDON，NIV を減少させた。同じ薬剤でも剤型により効果が異なり、チオファネートメチル粉剤はゾル剤と比較して防除効果・マイコトキシン低減効果が劣った。

b 耐雨性

チオファネートメチルゾル剤、同水和剤、およびメトコナゾール乳剤はいずれの試験でも耐雨性が強く、発病度およびDON，NIVの防除価の低下程度が低かった（中島ら、2006）。チオファネートメチル粉剤の耐雨性は水和剤およびゾル剤と比較して劣るが、弱雨（3.6mm/時×3時間）では効果の低下が見られなかった（中島ら、2006）。降雨による抑制効果の低下は発病度よりもDON，NIV汚染濃度により顕著に表れた。

（ｲ）イネ赤かび病の発病とかび毒汚染低減防除技術の開発

供試した穂いもち及びカメムシ防除剤の中でイネ赤かび病に防除効果が認められた薬剤はチオファネートメチル水和剤のみであった（図2511-2）。かび毒については チオファネートメチル水和剤、アゾキシストロビン水和剤F20が有意に低減した。アゾキシストロビン水和剤8を含め他の薬剤でもかび毒汚染濃度が増加するものはなかった。

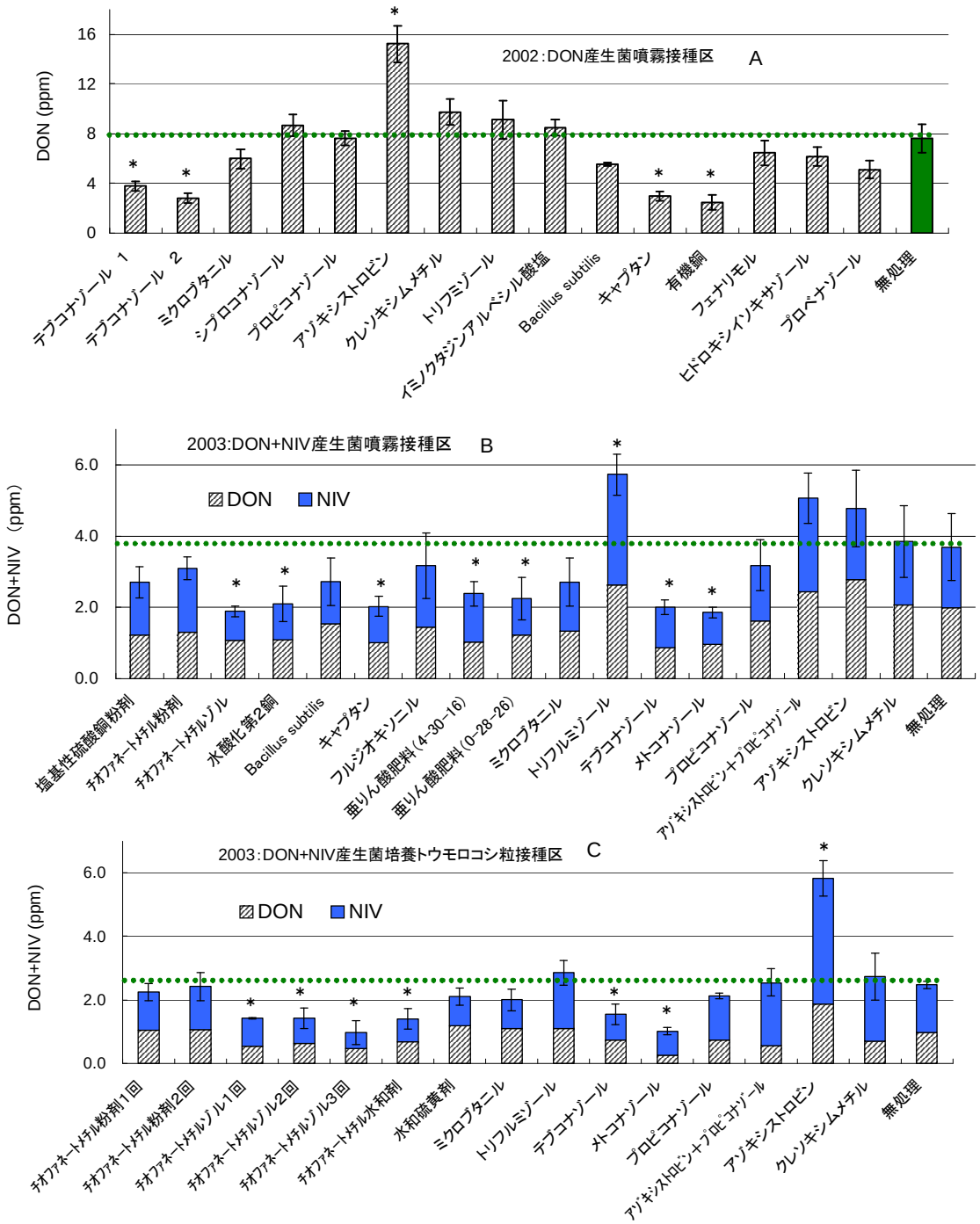


図2511-1　薬剤散布によるコムギ「チクゴイズミ」粒の DON および NIV の増減

注:　開花始めとその 1 週間後に薬剤を散布し(A, B, C)、開花盛期とその 1 週間後に病原菌を噴霧接種した(A, B)。バーは標準誤差。*: 無処理区と有意差あり ($p < 0.05$)　粉剤、ゾル剤以外は全て水和剤、それぞれ 4 kg, 0.8 L, 150L/10a 散布。 1 区0.8X 5　m、 3 反復乱塊法。九沖農研内の圃場試験

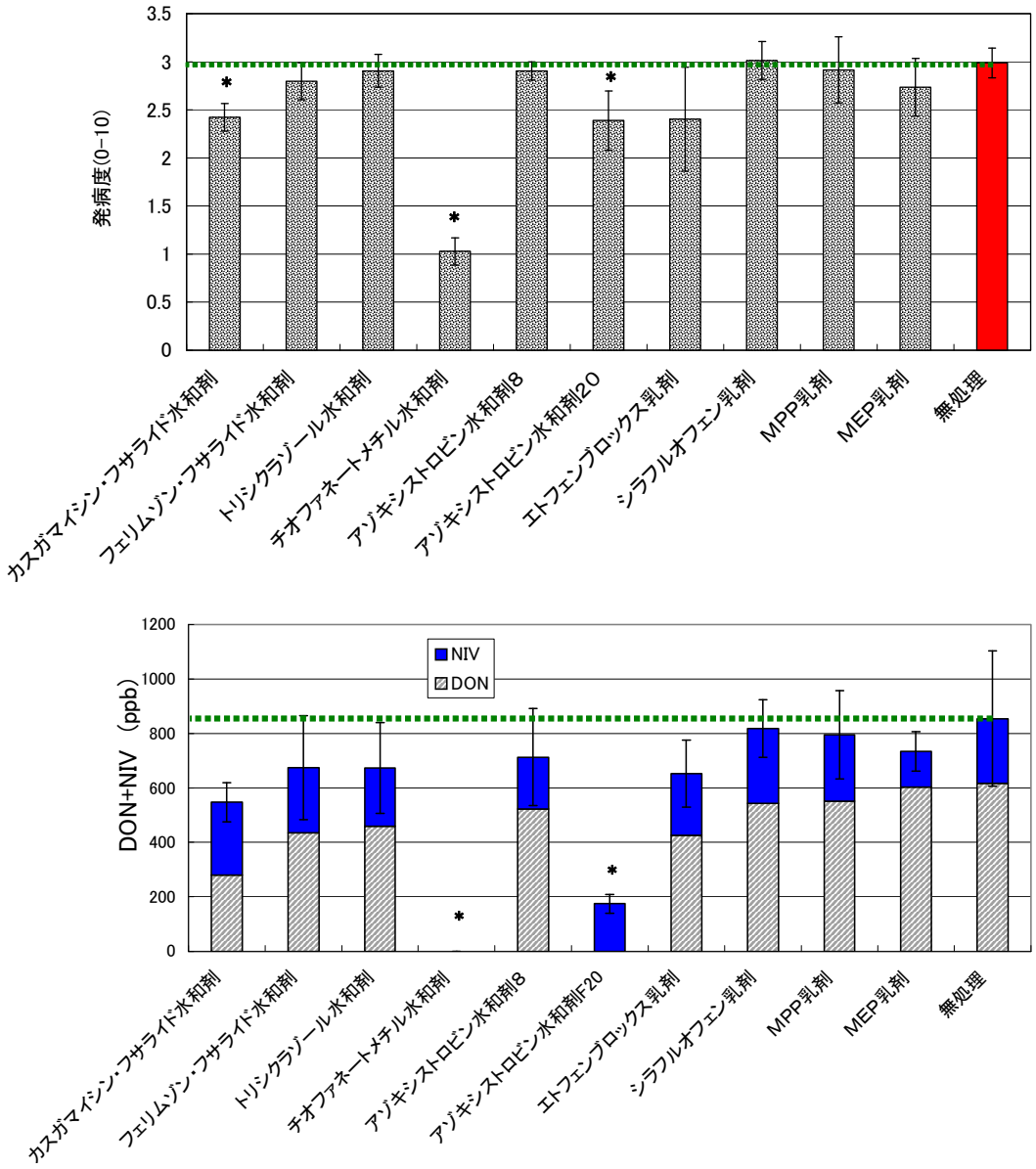


図2511-2　薬剤散布によるイネ「スプライス」粒の DON および NIV の増減

注：　1/5000ポットに栽培したイネの開花期に赤かび病菌を接種し、接種 3 日後に薬剤（穂いもち・カメムシ防除剤）を散布し、10日後に発病調査を行い収穫後の毒素分析を行った。 3 反復の平均値、バーは標準誤差。
＊：無処理区と有意差あり（$p < 0.05$）　全て水和剤、それぞれ150L/10a 散布。

エ　考　察

メトコナゾール、テブコナゾール、キャプタン、有機銅、無機銅、チオファネートメチル、亜りん酸肥料（下線の薬剤は2006年 8 月現在農薬登録がない）が優れた赤かび病抑制効果を示し、かび毒も有意に減少させた。これらの薬剤は赤かび粒率および外観健全流からの赤かび病菌の分離率も低減させたことから、病原菌の感染および増殖量を低減させることで DON、NIV を減少させたと推察される。いっぽう、アゾキシストロビンは発病を抑制する効果はある程度認められたが DON，NIV を増加させる事例が観察された。この現象は海外および他県の試験でも再現されているが、増加しない場合もあり、増加する時の条件および産生量が増加する機作を早急に明らかにする必要がある。筆者の行った試験では、アゾキシストロビンは治療効果が劣り、病原菌が存在する状態で散布すると毒素が増加すると推察された。以上のことから、農薬登録の際には DON および NIV の低減効果のデータも審査するように制度を改正するべきである。

オ　今後の課題

ムギ類赤かび病は難防除病害であり現状の農薬のレベルでは大発生時には十分な防除効果が得られない。このため、より有効な薬剤の開発、さらにマイコトキシンの生合成経路をブロックする機作を持つ新規薬剤の開発が望まれる。そのためには、新規薬剤の開発をターゲットとするトリコテセン生合成経路の解明が必要である。現状の薬剤についてはかび毒を低減する効果の高い剤は明らかになった。次の課題として、かび毒低減効果をエンドポイントとした散布適期については早急に明らかにする必要がある。

カ　要　約

メトコナゾール、テブコナゾール、キャプタン、チオファネートメチルが赤かび病マイコトキシンであるデオキシニバレノール（DON）、ニバレノール（NIV）の低減効果が高い。アゾキシストロビンは発病を抑制するが DON、NIV を増加させる事例があった。チオファネートメチルゾル剤、同水和剤、およびメトコナゾール乳剤はかび毒汚染濃度で評価しても耐雨性が高かった。チオファネートメチル水和剤はイネ赤かび病の防除およびかび毒低減効果が高かった。

キ　引用文献

Anderson, A. L. （1948） The development of Gibberella zeae headblight of wheat. Phytopathology 38:595-611

石井博（1961）麦類赤かび病の流行機構に関する研究．農林省振興局植物防疫課病害虫発生予察特別報告8:1-121.

石丸治澄・徳永初彦・宮川敏男・波多江政光（1970）九州地域における麦類赤かび病被害機構の解明．九州農試研究資料41:1-193.

仲川晃生・山口武夫・堀眞雄（1988）コムギ赤かび病の薬剤防除に関する研究（第 3 報）降雨による薬剤の効力低下とその対策について．近畿中国農研76:22-26.

中島隆・冨村健太・吉田めぐみ（2006）コムギ赤かび病防除薬剤の耐雨性の評価. 九州病害虫研究会報52:印刷中

研究担当者（中島隆*、吉田めぐみ）

12　コムギ赤かび病発生予測情報システムの開発

ア　研究目的

コムギ赤かび病は主に病原菌の子のう殻から子のう胞子が飛散し、これが開花期以降のムギ穂に感染して発生する。また、かび毒（DON 等）は病原菌の菌糸の進展にともないムギ粒中に蓄積する。そこで、赤かび病の感染の好適気象条件をモデル化した上で、アメダス等の気象データ、ならびにコムギの出穂期予測モデルを改良して組み合わせ、赤かび病の発生程度を予測するモデルの開発を行う。また、モデルによる予測結果について、インターネットを通して情報提供するシステムを開発する。

イ　研究方法

(ｱ) コムギの出穂期予測モデルの改良

九州沖縄農研気象特性研究室（丸山ら2002、黒瀬ら2004）において開発されたコムギの出穂期予測モデルのプログラムを、インターネット上でアメダス等の広域気象データを取得して実行できるように改良して再実装する。

(ｲ) 赤かび病発生程度の予測モデルの開発

コムギ赤かび病の感染の好適気象条件（Rossi et al. 2003）を、Duthie（1997）の病害発生予測式にもとづいてモデル化する。それをもとに、インターネット上でアメダス等の広域気象データを取得して、赤かび病発生程度の予測値を算出するプログラムを開発する。

ウ　研究結果

(ｱ) コムギ出穂期予測モデルの Java プログラム化

コムギの出穂期予測モデルを、モデル開発のためのフレームワーク（田中2006）を利用して、気象データ仲介ソフト MetBroker*1に対応した Java プログラムとして実装し直した。このプログラムは Java アプレットして、Web ブラウザ上で実行することができる（図2512-1）。また、品種‘農林61号’のパラメータ値を新たに算出してプログラムに導入した。ユーザは、播種日や対象品種を設定したり、MetBroker に対応したアメダスなどの気象データ観測地点を選択したりすることで簡単に実行可能である。このモデルを利用するには、Web ブラウザで http://cse.naro.affrc.go.jp/ketanaka/model/applet/WheatRipening.html にアクセスする。

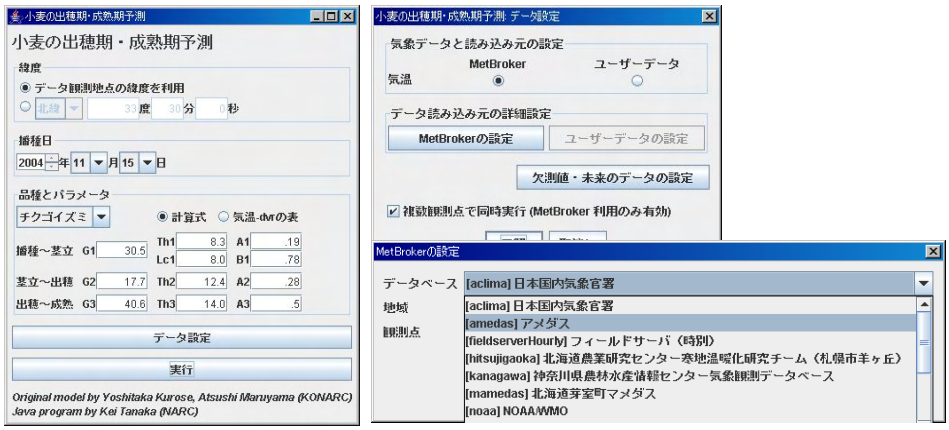


図2512-1　MetBroker 対応されたコムギの出穂期予測モデルの実行画面

1）コムギの出穂期予測モデル起動時の画面（左）

2）気象データ取得元（MetBroker）の設定画面（右）

(ｲ) 赤かび病発生程度の予測モデルの開発

コムギ赤かび病の感染の好適気象条件（気温と濡れ持続時間の関係から求められる）をモデル化し、それをもとに、赤かび病発生程度の予測値を算出するプログラムを、MetBroker 対応の Java プログラムとして開発した。プログラムの実行方法および操作方法は(ｱ)の出穂期予測プログラムとほぼ同様である。このモデルを利用するには、Web ブラウザで http://cse.naro.affrc.go.jp/ketanaka/model/applet/WheatDuthie.html にアクセスする。

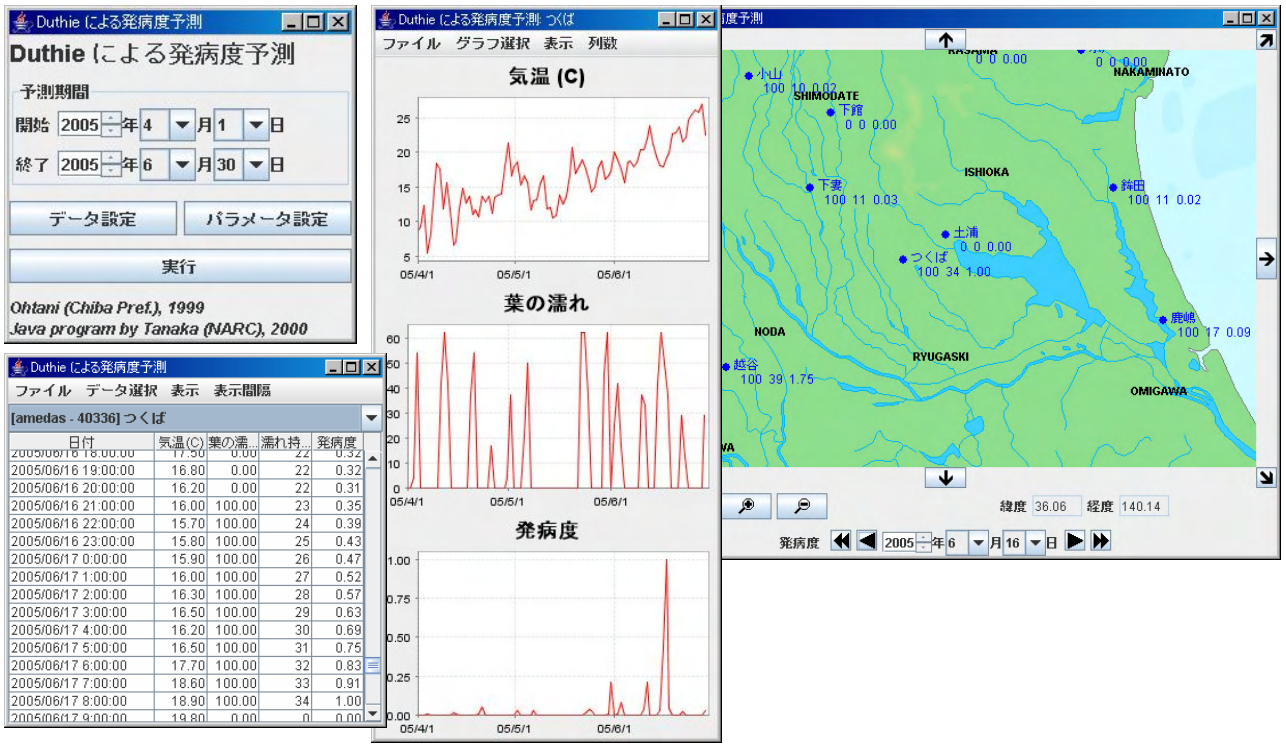


図2512-2　赤かび病発生程度の予測モデルの実行画面

1）赤かび病発生程度の予測モデル起動時の画面（左上）

2）モデルの実行結果の表示画面　表・グラフ・地図（左下・中・右）

*1：MetBrokerとは、気象データを必要とする農業モデル（アプリケーション）に対し、インターネット上の各種の気象データベースへの統一的なアクセス手法を提供するものである。アメダス、気象管署、NOAAなどの気象データベースを利用できる。

エ　考　察

(ｱ) コムギの出穂期予測モデルのJavaプログラム化

既存のコムギ出穂期予測モデルを、気象データ仲介ソフトMetBroker対応のJavaプログラムとして再実装した。ユーザは、このモデルを播種日や品種、アメダス地点等の気象データを設定して、Webブラウザ上で自由に実行することができるようになった。

(ｲ) 赤かび病発生程度の予測モデルの開発

ナシ黒星病の発生予測モデルとしてすでに利用し（菅原ら2002）、実績のあったDuthieによる式を、コムギ赤かび病の感染の好適日を推定するモデルに適用した。(ｱ)と同様に、ユーザが利用する気象データを設定でき、Webブラウザ上で実行することができるJavaプログラムとして開発した。

オ　今後の課題

(ｱ) コムギ出穂期予測モデルについて、他の品種のパラメータ値も求めることにより、モデルの対応品種を増やす必要がある。また、出穂期のほか赤かび病の感染が起こりやすい開花期をより正確に予測できるように、モデルの改良・検証が必要である。

(ｲ) 赤かび病発生予測モデルを実用的にするには、コムギ出穂・開花期予測モデルと赤かび病発生予測モデルを組み合わせ、一つのモデルのように利用できる必要がある。また、気象データ取得元としてMetBrokerだけではなく、各圃場ごとに設置できるフィールドサーバ等で観測した局所データの利用なども検討していく必要がある。

カ　要　約

コムギの赤かび病の感染好適期間である開花期を予測するために、コムギの出穂期予測モデルをMetBroker対応のJavaプログラムとして開発した。さらに、赤かび病発生程度の予測モデルも同様にMetBroker対応のJavaプログラムとして開発した。これらのプログラムは、Webブラウザ上でそのまま実行することができる。また、利用する気象データ取得元を、MetBrokerに対応した多くの気象データベースから選択することができる。

キ　引用文献

Duthie, J. A. 1997. Models of the response of foliar parasites to the combined effects of temperature and duration of wetness. Phytopathology. 87:1088-1095.

黒瀬義孝ら 2004. インターネットを使った小麦の出穂期，成熟期予測情報の提供．九州農業研究. 66:23.

丸山篤志ら 2002. 秋播性程度の異なるコムギ3品種のDVR法による出穂期予測．九州農業研究. 64:15.

Rossi, V. et al. 2003. A model estimating the risk of Fusarium head blight on wheat. Bulletin OEPP/EPPO. 33:421-425.

菅原幸治ら 2002. 気象データベースと連携したナシ病害発生予察モデルの開発．農業環境工学関連4学会2002年合同大会講演要旨．224.

田中 慶 2006. Javaによる作物生育・病害虫発生予測モデル開発のためのフレームワーク．農業情報研究. 15（2）:183-194.

研究担当者（田中慶*、菅原幸治、平藤雅之、小泉信三）

13　赤かび病菌のマイコトキシン産生抑制型品種の探索と利用技術の開発

ア　研究目的

最近の研究により、外観健全な麦粒からもマイコトキシン（かび毒）が検出され、品種抵抗性とマイコトキシン産生性は必ずしも一致しない事例が明らかになっている。このため、品種抵抗性の発現機構とマイコトキシン産生様式との関係をより詳細に検討するとともにマイコトキシン産生抑制型品種を探索し、既存の抵抗性品種の利用と併せて効率的かつ総合的な抵抗性品種の利用技術を確立する。また、病原菌の侵入行動とマイコトキシン産生性との関係

の究明を試み、マイコトキシン産生抑制型品種の探索に役立てる。

イ　研究方法

(ｱ) 赤かび病に対する抵抗性の異なる品種におけるマイコトキシン産生性をより詳細に検討し、マイコトキシン産生抑制型品種の探索に役立てる。標準・比較品種として、次の 6 品種を用いた。①Gabo（抵抗性極弱)。②ゴガツコムギ（弱)。③あやひかり（中～やや弱)。④農林61号（中～やや強)。⑤蘇麦 3 号（極強)。⑥延岡坊主小麦（極強)。これらのほか、あやひかりの両親と祖先品種・系統を供試した。2003年は関東107号、西海168号、西海155号、シロガネコムギの 4 品種を用いた。このうち、関東107号は母本、西海168号（きぬいろは）は父本である（2002年10月播種)。サンプリングはいずれの品種も成熟期～枯熟期頃に行い、マイコトキシン分析（ELISA 法）には、2.2 mm の縦目篩にかけた整粒を供試した。

(ｲ) (ｱ) と同様に 6 標準・比較品種のほか、2004年は関東79号、関東82号、西海155号、西海104号、ジュンレイコムギ、シラサギコムギの 6 品種を用いた（2003年10月播種)。サンプリングとマイコトキシン分析（ELISA 法）は、(ｱ) と同様である。

(ｳ) 極弱品種の Gabo を用いた接種試験（ポット試験）により、コムギの生育時期とマイコトキシン産生量との関係について検討した。コムギはシードリングケースに栽培し、接種には DON（デオキシニバレノール)、NIV（ニバレノール）産生菌の *Fusarium graminearum* H3 菌（のちに農業生物資源研究所ジーンバンクに寄託、登録番号 MAFF 101501) を用いた。

ウ　研究結果

(ｱ) 赤かび病の初発生は 5 月13日で例年よりやや早くまた病勢進展も著しく、開花終期以降、弱品種では発病度90以上に達した。発病を促すためスプリンクラーで散水した区では、抵抗性品種でも容易に発病穂が認められた。散水区における外観汚染粒（軽

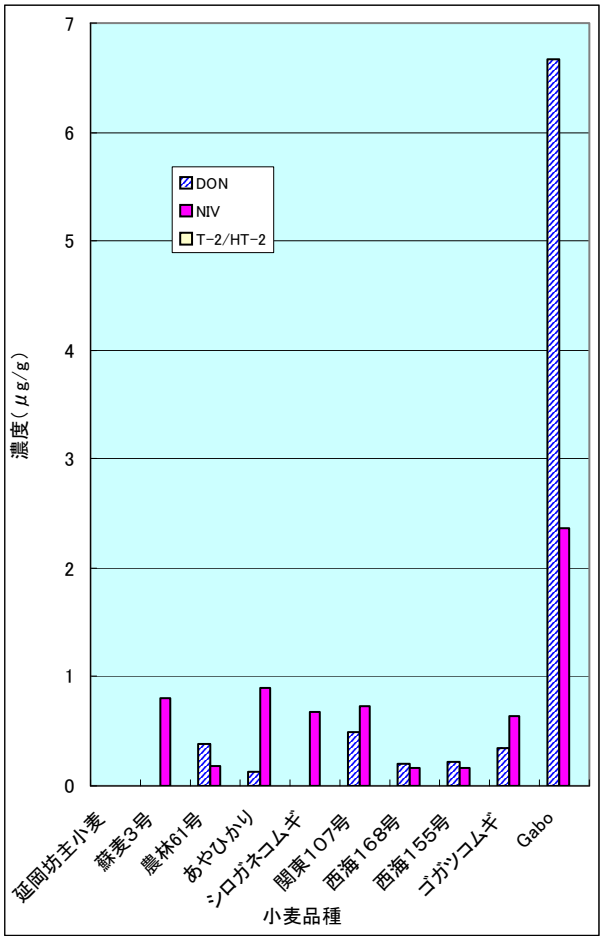


図2513-1　2003年産小麦のトリコテセン系マイコトキシンの産生量（自然発病、無散水）

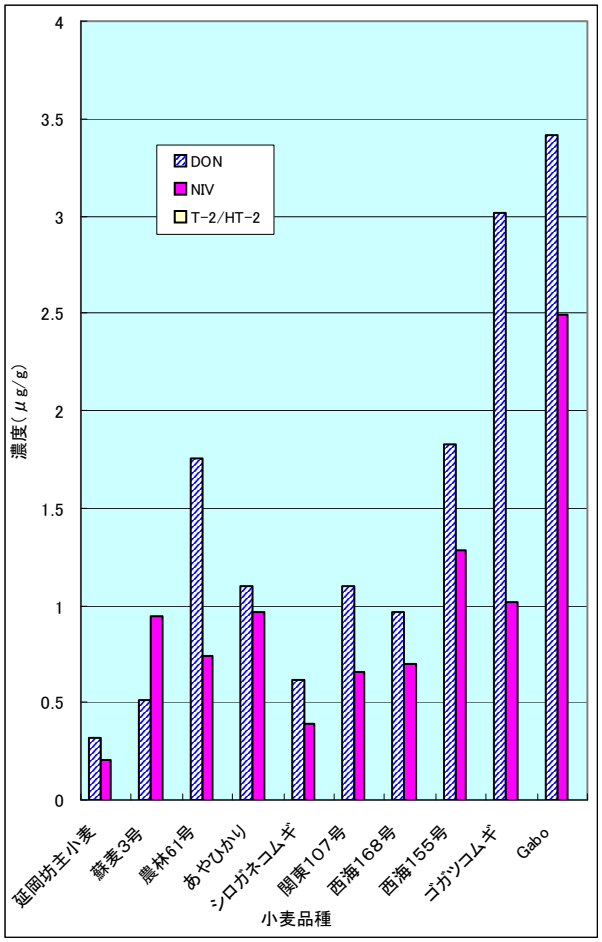


図2513-2　2003年産小麦のトリコテセン系マイコトキシンの産生量（自然発病、散水）

度赤かび病粒）率をみると、抵抗性品種では２％未満、農林61号で4.8%、あやひかりとその交配親など関連品種及びゴガツコムギでは９％前後、極弱品種の Gabo では75.7%であった。散水区では、供試10品種すべてに DON と NIV の産生が認められた。T-2トキシンはいずれの品種でも検出されなかった。DON と NIV の産生量は、必ずしも抵抗性の序列とは一致せず、あやひかりの軽度赤かび病粒率はゴガツコムギと同程度で農林61号よりも高いが、DON の産生量はこれらの品種より明らかに低かった。また、抵抗性極強の蘇麦３号の NIV の産生量はあやひかりと同程度であった。一方、延岡坊主小麦の DON、NIV 産生量は他品種よりも低かった。あやひかりの両親の DON、NIV 産生量はあやひかりと同程度かそれ以上であったが、祖父に当たる西海155号の産生量はかなり多かった。これに対し、曾祖父に当たるシロガネコムギの産生量は明らかに低かった（図2513-1、図2513-2）。

（イ）赤かび病の初発生は５月11日で例年よりやや早く全体的には中程度の発生となった。散水区における外観汚染粒（軽度赤かび病粒）率をみると、抵抗性品種では２％未満、農林61号で3.8%、あやひかり、西海155号、西海104号、シラサギコムギは４～６％、その他の祖先種は２％前後、ゴガツコムギは7.3%、極弱品種の Gabo では71.6%であった。散水区では、供試12品種すべてに DON か NIV の一方または両者の産生が認められた。T-2トキシンは検出されなかった。DON と NIV の産生量は、必ずしも抵抗性の序列とは一致せず、あやひかりの軽度赤かび病粒率はゴガツコムギと同水準で農林61号よりも高いが、

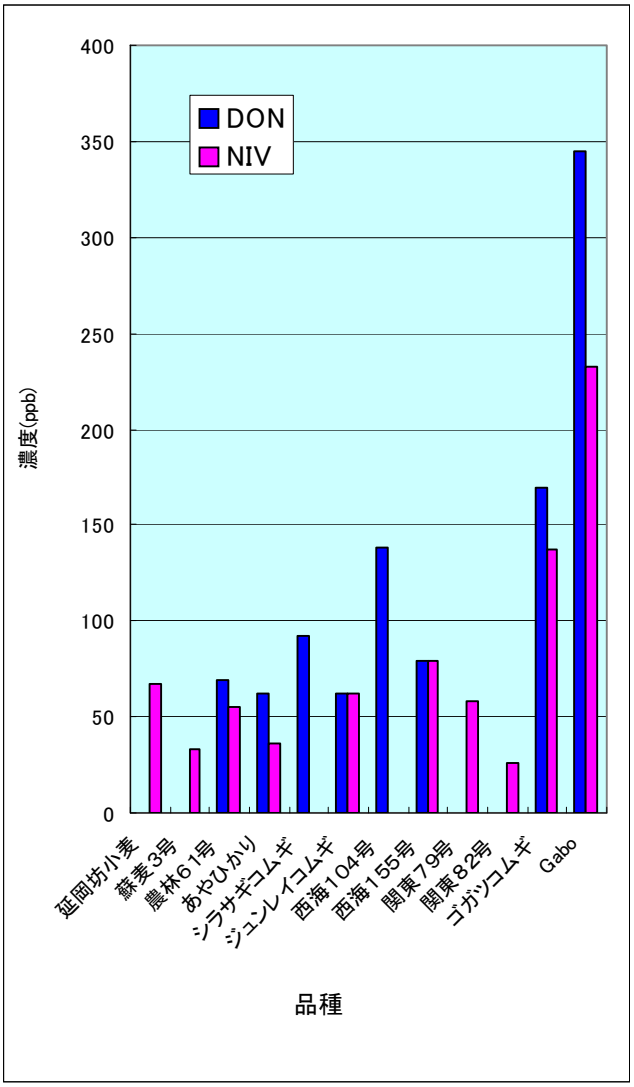


図2513-3　あやひかりの祖先種のマイコトキシン産生量
（2004年、散水区）

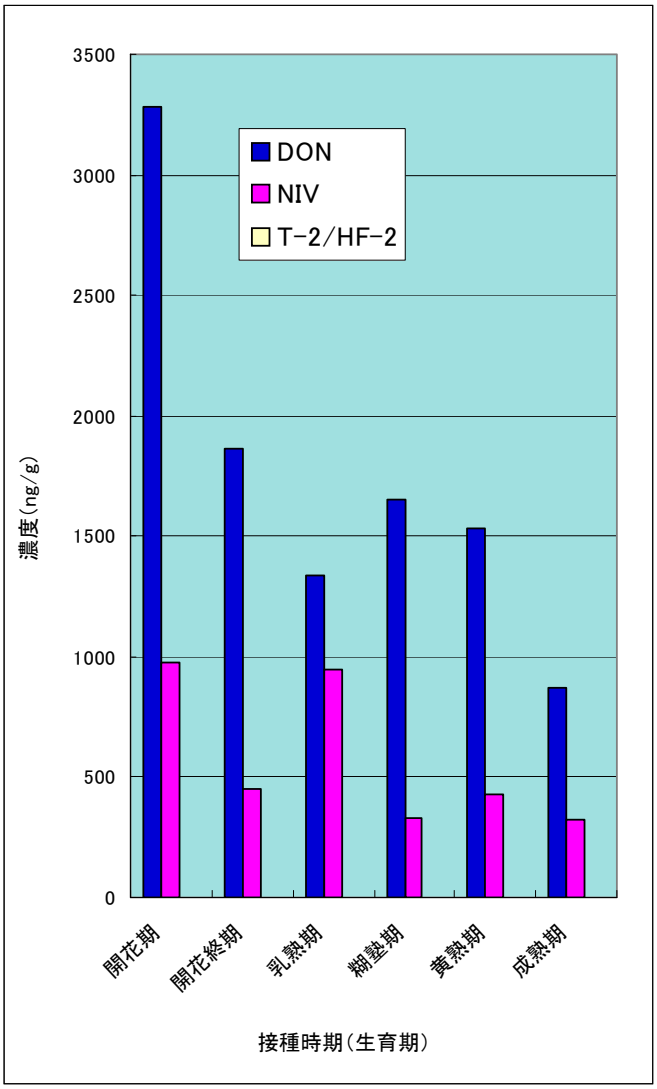


図2513-4　接種時期（生育時期）別マイコトキシン産生量
（極弱品種 Gabo、接種試験）

DONの産生量はこれらの品種より明らかに低かった。また、抵抗性極強の延岡坊主小麦、蘇麦3号のNIVの産生量はあやひかりと同程度か多い傾向であった。あやひかりの祖先種のうち、関東79号と関東82号ではDONの産生は認められなかった。一方、シラサギコムギと西海104号ではNIVの産生は認められなかった（図2513-3）。系譜分析の結果、多発生の2003年を除き、あやひかりの祖先種のうち母系の関東79号と関東82号ではDONの産生が認められず、父系のシラサギコムギと西海104号ではNIVの産生は認められなかった。このことから、あやひかりのマイコトキシン蓄積耐性は父系、母系双方の祖先種に由来する可能性が高いと推定された。

(ｳ) 極弱品種のGaboを用いた接種試験により、コムギの生育時期とマイコトキシン産生量との関係を検討した結果、NIVの産生は生育期前半に多い傾向がみられたが、DONは生育初期に多く黄熟期まで高レベルでの産生が認められた（図2513-4）。

エ　考　察

コムギ品種あやひかりの赤かび病抵抗性は中程度であるが、本品種ではDONやNIV、とくにDONの産生量は年次変動が見られず常に少なかった。あやひかりは、マイコトキシン産生抑制型コムギ品種と位置づけられる。また、この事実は、コムギ品種の赤かび病抵抗性程度とマイコトキシン、とくにDONの産生量は必ずしも相関しないことを意味する。系譜分析の結果、あやひかりのマイコトキシン蓄積耐性は父系、母系双方の祖先種に由来する可能性が高いと推定された。

オ　今後の課題

赤かび病菌の病原性、侵入行動とマイコトキシン産生能との関係を検討し、同時に赤かび病抵抗性とマイコトキシン産生性との関係を解明する必要がある。また高品質で実用的なマイコトキシン産生抑制型品種を探索するとともに、品種開発をさらに進める必要がある。

カ　要　約

コムギ品種の赤かび病抵抗性程度とマイコトキシン、とくにDONの産生量とは必ずしも相関しなかった。あやひかりは抵抗性が中程度であるが、DONやNIVの産生量は常に少なく、マイコトキシン産生抑制型品種と位置づけられる。系譜分析により、あやひかりのマイコトキシン蓄積耐性は父系、母系双方の祖先種に由来する可能性が高い。

キ　引用文献

齊藤初雄・田中健治：コムギ赤かび病被害粒におけるマイコトキシン産生量の品種間差異(2)．平成16年度日本植物病理学会大会講演要旨集　講演番号254（2004）

田中健治・佐藤　剛・齊藤初雄：農薬を散布した場合のトリコテセン系マイコトキシンの産生性．平成15年度日本植物病理学会大会講演要旨集、講演番号319（2003）

吉田　久・乙部（桐渕）千雅子・柳澤貴司・山口勲夫・瀬古秀文・牛山智彦・天野洋一・小田俊介・宮川三郎・黒田　晃：小麦新品種「あやひかり」の育成．農研センター報告　34　17-35（2001）

研究担当者（齊藤　初雄*・田中　健治）

14　マイコトキシン生産菌の環境動態に及ぼす特異作用点阻害型殺菌剤の影響解明

ア　研究目的

コムギ赤かび病を引き起こす数種の*Fusarium*属菌には、デオキシニバレノール（DON）などのマイコトキシンを生産する菌が含まれ、コムギ種子の汚染が問題となる。コムギ赤かび病の防除には、ベンゾイミダゾール系やストロビルリン系などの特異作用点阻害型殺菌剤が用いられるが、ベンゾイミダゾール系薬剤耐性菌が中国（Gale et al. 2002）のほか最近我が国の一部（岩間ほか2004；投稿中，吉松ほか2006）にも出現している。また、ストロビルリン系薬剤が赤かび病菌のDON生産を助長すると報告されている（Pirgozliev et al. 2002，相馬2004）が、その原因は明らかでない。そこで、これらの特異作用点阻害型殺菌剤の使用が、圃場環境における*Fusarium*属菌の動態に及ぼす影響を分子疫学的手法などにより解析する。

イ　研究方法

(ｱ) コムギ赤かび病菌の薬剤感受性の種間・種内比較

赤かび病の病原菌として知られる数種の*Fusarium*属菌について、ベンゾイミダゾール系薬剤、ステロール脱メチル化阻害剤（DMI剤）、ストロビルリン系薬剤に対するベースライン感受性を培地上で検定し、種間・種内で比較する。

(ｲ) 薬剤感受性判別の分子マーカーの検討

赤かび病菌のベンゾイミダゾール系薬剤やストロビルリン系薬剤に対する感受性を判別するための分子マーカーを作出するために、これらの薬剤の作用点たんぱく質であるβ－チューブリンやチトクローム *b* の遺伝子を菌から PCR 増幅し、塩基配列を解析する。また、ベンゾイミダゾール系薬剤については、耐性菌と感受性菌でβ－チューブリン遺伝子の塩基配列を比較する。

(ｳ) 赤かび病菌の活性酸素生成等に及ぼすストロビルリン系薬剤の影響解析

赤かび病菌にストロビルリン系薬剤アゾキシストロビンを処理し、菌における活性酸素生成や alternative oxidase 遺伝子（*AOX*）の発現を、培養実験と蛍光測定法、リアルタイム PCR やノーザンハイブリダイゼーション等により解析する。

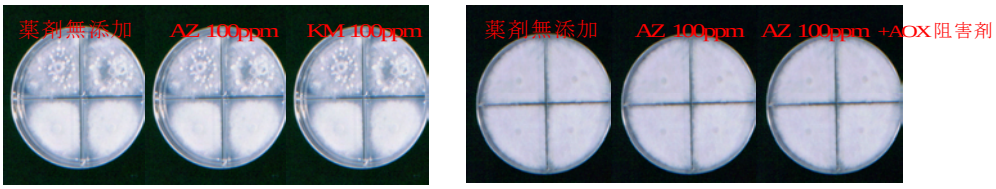
(ｴ) 赤かび病菌の DON 生成に及ぼすストロビルリン系薬剤の影響評価

アゾキシストロビン処理に伴う赤かび病菌の DON 生成増大の有無を、培地や麦粒、コムギ植物体への菌の接種や ELISA 法、HPLC 分析により調べる。

ウ　研究結果

(ｱ) 生物研微生物ジーンバンクより分譲された *F. acuminatum*、*F. avenaceum*、*F. culmorum*、*F. equiseti*、*F. graminearum*、*F. poae*、*F. sporotrichioides* に対しては、ベンゾイミダゾール系薬剤チオファネートメチルの MIC（最小生育阻止濃度）が10ppm または 3 ppm（有効成分濃度、以下同様）であったが、*Microdochium nivale* には既報（小泉ほか1993）のように薬剤感受性が著しく低い耐性菌株があった。DMI 剤テブコナゾールに対する感受性はいずれの種も概して高く、10ppm でほとんどまたは全く生育しなかった。ストロビルリン系薬剤アゾキシストロビン（AZ）やクレソキシムメチル（KM）は *F. graminearum* ほかに対する PDA 上での菌糸生育阻害活性が本来低く、本法で菌の感受性を正確に検定することは困難であったが、*M. nivale* は特異的に薬剤感受性が高く、1 ppm で生育が50%以上阻害された（図2514-1）。島根県防除所より分譲された DMI 剤トリフルミゾールに対する感受性低下菌はテブコナゾール感受性もやや低かった。

後述する遺伝子診断により、青森農総研より分譲の赤かび病菌のうち、チオファネートメチル耐性菌は *F. culmorum*、感受性菌は *F. graminearum* と同定された。また、大分農技センターより分譲のチオファネートメチル耐性菌は *F. graminearum* と同定され、もともとチオファネートメチル感受性がやや低い *F. avenaceum* とは区別された。



Microdochium nivale　　Fusarium graminearum

図2514-1　コムギ赤かび病菌のストロビルリン系薬剤感受性

ベンゾイミダゾール系薬剤耐性菌	GCG(Ala)	ACT(Thr)	TTC(Phe)
耐性菌	AAG(Lys)	ACT(Thr)	TTC(Phe)
感受性菌	GAG(Gly)	ACT(Thr)	TTC(Phe)
	コドン 198		200

図2514-2　コムギ赤かび病菌
Microdochium nivale のβ－チューブリン遺伝子変異

(ｲ) 各種植物病原菌のベンゾイミダゾール系薬剤耐性菌では、薬剤の作用点たんぱく質β－チューブリンをコードする遺伝子に点変異がみられ、β－チューブリンのアミノ酸置換による薬剤の結合親和性低下が耐性化の主因と考えられている（Ishii 2001）。そこで、*M. nivale* のβ－チューブリン遺伝子をシークエンス解析した結果、ジエトフェンカルブに負相関交さ耐性を示すチオファネートメチル高度耐性菌ではアミノ酸コドン198がチオファネートメチル感受性菌の GAG（Glu）から GCG（Ala）に、またジエトフェンカルブに負相関交さ耐性を示さないチオファネートメチル高度耐性菌では AAG（Lys）に置換していた（図2514-2）。この遺伝子変異は *M. nivale* におけるベンゾイミダゾール系薬剤耐性のマーカーとして利用することが可能と思われた。

一方、青森県産の *F. culmorum* や大分県産の *F. graminearum* に見いだされたチオファネートメチル耐性菌には、β－チューブリン遺伝子のコドン198や200に変異はみられなかった。中華人民共和国から輸入した *F. graminearum* 菌株にも、β－チューブリン遺伝子の解析部位に耐性変異はみられなかった。

このほか、チトクローム b 遺伝子や他の *Fusarium* 属菌から PCR 増幅されたβ－チューブリン遺伝子についても、シークエンスを解析した。

(ｳ) 2003年 8 月、クレソキシムメチル剤を 2 回散布した十勝農試の春まきコムギ圃場から麦粒を採取、素寒天上で菌を分離後、SNA 培地へ移植、形成された菌そうから電子レンジで直接 DNA を抽出した。薬剤無散布区からの試料を対照として用いた。DNA をいったん凍結保存後、β－チューブリン遺伝子断片を PCR で増幅し、PCR-Luminex 法で菌種を同定した。

表2514-1　PCR-Luminex 法の赤かび病菌同定への適用

菌株	プローブ				
	なし	Fg2	Fc2	Fa3	Mn
Blank	37.0	37.0	44.0	65.5	24.0
F. graminearum					
101032	33.5	749.0	66.0	72.0	40.0
101053	31.0	582.0	55.0	74.0	27.0
305135	62.5	1672.0	218.0	144.0	40.0
F. culmorum					
101144	32.0	203.5	1190.0	111.5	39.0
236455	37.0	46.5	206.0	21.0	76.0
F. avenaceum					
235547	33.0	43.0	32.0	564.5	29.0
235734	38.0	42.0	40.0	200.0	707.0
M. nivale					
101046	40.0	32.0	37.0	103.5	2094.0
236681	41.0	36.0	47.0	927.5	4275.0
305033	34.0	35.5	43.0	85.0	3750.0

表中の数字は蛍光値。

コムギ圃場から分離した菌を PCR-Luminex 法で同定した結果、薬剤無散布区の内訳は、*F. graminearum* 62.2%、*F. avenaceum* 29.6%、*M. nivale* 5.1%、*F. culmorum* 3.1%であった。これに対してクレソキシムメチル散布区では、マイコトキシン DON の産生種 *F. graminearum* が81.4%と高く、*F. culmorum* は2.3%、*F. avenaceum* は16.3%で、DON 産生が知られていない *M. nivale* は検出されなかった。圃場における薬剤散布が赤かび病菌の種構成に影響することが、今回の試験からも示された。

九州沖縄農研でコムギ（*F. graminearum* を接種し、トリフルミゾール剤を散布）より分離された菌株及び対照菌株はすべて、トリフルミゾール 1 ppm 添加 PDA 培地上でで50%以上菌糸生育が抑制され、感受性菌と判定された。但し、100 ppm でも生育自体はみられるため、生育の有無のみを判定基準とする MIC による薬剤感受性の判定は、トリフルミゾールの場合不適当であった。

(ｴ) DON 産生能をもつ *F. graminearum* 菌株（中央農研より分譲）をアゾキシストロビン処理すること

により、菌体中の過酸化水素量が増加することを蛍光試薬 carboxyl-H_2DCFDA を用いた定量試験により（図2514-3）、また、酸素消費量が増大することをOxygraph で確認した。

さらに、この菌株をアゾキシストロビン添加 Vogel's 変法培地で培養した結果、薬剤無添加に比べて alternative oxidase（*AOX*）遺伝子の転写活性が増大していた（図2514-4）。

（オ）培地や麦粒にアゾキシストロビン処理後赤かび病菌を接種しても、DON の蓄積増大は確認出来なかった。また、温室で栽培したコムギの開花期にアゾキシストロビンを散布、*F. graminearum* を接種後、成熟麦粒中の DON を定量したが、薬剤処理による DON の蓄積増大を確認することは出来なかった（図2514-5）。

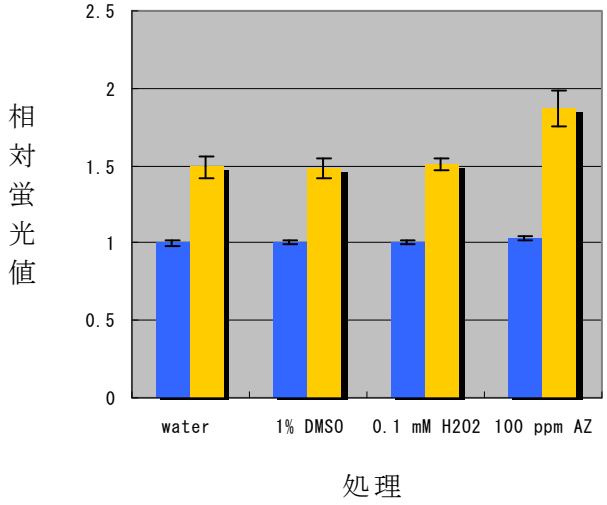


図2514-3　アゾキシストロビン(AZ)による赤かび病菌の過酸化水素蓄積の増大
（黄色，蛍光色素添加；青色，無添加）

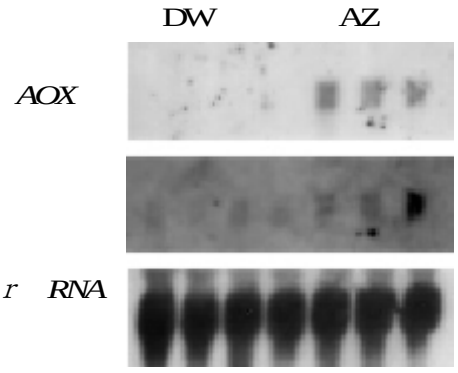


図2514-4　アゾキシストロビン(AZ）による
F. graminearum *AOX* 遺伝子の発現増大

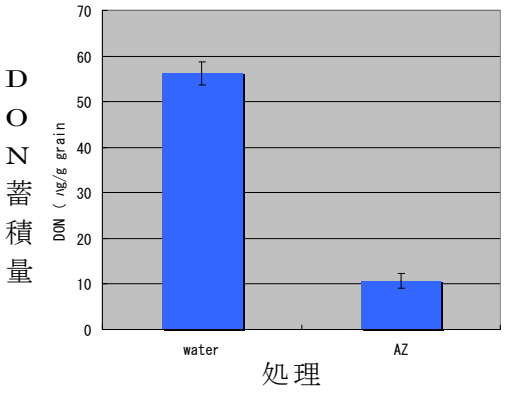


図2514-5　赤かび病菌の DON 蓄積に及ぼす
アゾキシストロビン（AZ）の影響

エ　考　察

（ア）薬剤耐性を論じるにあたっては、その病原菌の薬剤に対するベースライン感受性を予め調べておくことが重要である。そこで、赤かび病の主要病原菌について、ベンゾイミダゾール系薬剤、DMI 剤、及びストロビルリン系薬剤に対するベースライン感受性データを、薬剤添加培地上での培養試験により取得した。その結果、*F. culmorum* や *F. avenaceum* のチオファネートメチル剤に対するベースライン感受性（MIC：10ppm）は *F. graminearum*（MIC：3ppm）に比べてやや低いことが判明した。本来の薬剤感受性が赤かび病菌の種によって異なるという知見は、

今後薬剤耐性菌をモニターする上で有益な情報となる。一方、*M. nivale* 以外の赤かび病菌たとえば *F. graminearum* では、ストロビルリン系薬剤に対する感受性を培地上で検定することは難しい。これは、同薬剤によりミトコンドリア電子伝達系の複合体Ⅲを阻害するのに伴って、alternative oxidase（AOX）の活性化が起こるためと考えられた。

(ｲ) 薬剤耐性の分子マーカーを作出する目的で、ベンゾイミダゾール系薬剤の作用点たんぱく質β－チューブリンについて、遺伝子の塩基配列を解析した。耐性菌のコドン198に特徴的に見いだされた点変異（G198A または G198L）に基づき、*M. nivale* のチオファネートメチル高度耐性マーカーを得ることが出来た。しかし、*F. graminearum* のβ－チューブリン遺伝子にチオファネートメチル剤に対する耐性変異を見いだすことは出来なかった。これは、中国産の *F. graminearum* を用いた場合も同様であった。したがって、*F. graminearum* においてはβ－チューブリン遺伝子の他の部位に変異が生じているか、あるいは全く異なる耐性機構が関与することが考えられる。

(ｳ) クレソキシムメチル剤を散布したコムギ圃場では、薬剤無散布圃場に比べて、マイコトキシン DON の産生種 *F. graminearum* の分離比率が高く、DON 非産生性の *M. nivale* は検出されなかった。培地上で *F. graminearum* と *M. nivale* の間にみられた、クレソキシムメチル感受性の違いを反映している可能性がある。

(ｴ) *F. graminearum* をアゾキシストロビン存在下で培養することにより、活性酸素種の 1 つである過酸化水素の蓄積量が増大し、これに伴って *AOX* 遺伝子の転写活性も増大していた。また、酸素消費量が増大することも確認できた。このような酸化ストレスが *F. graminearum* の DON 合成酵素遺伝子の発現増大、さらには DON の蓄積増大を引き起こすのではないかと考えた。しかし、アゾキシストロビン処理によって DON の蓄積が増大するような実験系を構築することが出来ず、結果的に上記の仮説を実証するには至らなかった。

オ　今後の課題

(ｱ) 赤かび病菌のチオファネートメチル剤に対する耐性検定は、薬剤添加培地上での菌糸生育試験が可能なため、耐性菌の遺伝子診断法開発は必須ではない。しかし、新たな耐性機構が見いだされる可能性があり、基礎研究として取り組む価値はある。一方、*F. graminearum* のストロビルリン系薬剤感受性の検定は、培地を用いた検定では今のところ不十分であるので、これに代わる方法としてチトクローム *b* 遺伝子を用いた遺伝子診断がやがて必要になろう。ただしその際、チトクロームｂ遺伝子におけるヘテロプラスミーの有無や変異遺伝子の定量法の検討などが重要である。

(ｲ) 防除薬剤の散布によるマイコトキシン蓄積量の増大は、農薬の環境影響に関して新たな問題を提起している。本研究において、その原因を究明することは出来なかったが、食の安全確保のためには、今後更なる原因究明が必要であろう。

カ　要　約

(ｱ) わが国に分布する赤かび病の主要病原菌について、ベンゾイミダゾール系薬剤、DMI 剤、及びストロビルリン系薬剤に対するベースライン感受性データを取得した。

(ｲ) 赤かび病菌のうち、*M. nivale* においてベンゾイミダゾール系薬剤耐性の分子マーカーを得ることが出来た。しかし、*F. graminearum* のベンゾイミダゾール耐性菌と感受性菌には、β－チューブリン遺伝子の塩基配列に違いがみられず、マーカーを得ることは出来なかった。

(ｳ) コムギ圃場におけるストロビルリン系薬剤の散布が、赤かび病菌の種構成に影響することが示された。

キ　引用文献

Gale, L. R. et al. 2002. Population analysis of Fusarium graminearum from wheat fields in Eastern China, Phytopathology. 92：1315-1322.

Ishii, H. 2001. DNA-based approaches for diagnosis of fungicide resistance. J. M. Clark and I. Yamaguchi eds. Agrochemical Resistance：Extent, Mechanism, and Detection. Amer. Chem. Soc. 242-259.

岩間俊太・勝部和則・成田　治・石川邦彦・坂本伸子．2004．青森県におけるチオファネートメチル耐性コムギ赤かび病菌 *Fusarium culmorum* の発生．北日本病虫研報．55：269.

Pirgozliev, S. R., Edwards, S. G., Hare, M. C. and Jenkinson, P. 2002. Effect of dose rate of azoxystrobin and metconazole on the development of Fusarium head blight and the accumulation of deoxynivalenol (DON) in wheat grain. Eur. J. Plant

Pathol. 108：469-478.

相馬　潤．2004．北海道における春まきコムギのデオキシニバレノール汚染低減に向けた当面の対策．植物防疫．58：172-175.

吉松英明・冨村健太・石井英夫・大久保裕行・中島　隆・挾間　渉．2006．チオファネートメチル剤に対する *Fusarium graminearum* の耐性菌の初確認と *Fusarium avenaceum* のベースライン感受性．日植病報．72：32（講要）．

研究担当者（石井英夫*）

15　北海道における主要小麦品種の赤かび病抵抗性発現とマイコトキシン産生性との相互作用の解明

ア　研究目的

北海道においては、数種の *Fusarium* 属菌、および *Microdochium nivale* による麦類赤かび病が多発し、麦類の収量や品質を著しく低下させ、かび毒の麦粒への汚染が危惧されている（北海道植物防疫協会2004、相馬・角野2003）。赤かび病に対して有効な対策である抵抗性品種の育種は、免疫抵抗性の不在や抵抗性機構の不明などが障害となって難しい状況にある。抵抗性品種の効率的育種には赤かび病菌に対する品種反応やその抵抗性機構の解明などの基礎的知見を得ることが重要な課題となる。本課題では北海道産主要小麦品種の赤かび病抵抗性反応の解明およびかび毒産生と抵抗性発現の相互作用の解明を目的としている。

イ　研究方法

(ｱ) 小麦の赤かび病抵抗性反応の観察

北海道産主要春まき小麦品種を枠圃場およびガラス温室で育成し、赤かび病菌 *Fusarium graminearum* H3株を接種後、発病した穂をそれぞれ切断して採取し、小穂部のパラフィン包埋切片を作製後、チオニン、ファストグリーン、オレンジ G で多重染色し、赤かび病菌の動態を顕微鏡下で観察した。

(ｲ) 主要品種におけるかび毒産生量の調査

春まき小麦 5 品種を枠圃場に 4 月中に播種し、それぞれの品種の開花初期、開花盛期、開花後期に H3 株の胞子懸濁液（約10^5個/ml）を穂の部分に噴霧接種した。接種後、麦の周囲を寒冷紗で囲み、 1 日数回スプリンクラーで散水し、湿度を保った。小麦を収穫後、乾燥させてから試験用脱穀機で脱穀し、2.2mm の篩で精選した。デオキシニバレノール（DON）、ニバレノール（NIV）量は麦粒を協和メデックス（株）に送り、ELISA 法によって求めた。

(ｳ) 赤かび病菌感染によるかび毒産生量の経時的変化の調査

上記枠圃場で育成し、開花盛期および開花後期に菌の接種を行った各小麦品種より、接種 1 ～ 4 週間後に穂軸基部より穂を切断して採取し、発病度を調査、乾燥後、穂軸より小穂および麦粒を分離し、ELISA キット（協和メデックス）によって各部位のかび毒産生量　（DON，NIV）を測定した。

(ｴ) 定量 PCR 法による赤かび病菌感染量の経時的変化の調査

かび毒産生量の経時的変化の測定で用いた小麦穂サンプルから CTAB 法により全 DNA を抽出し、定量 PCR 法（Edwards ら、2001）を用いて植物体中の赤かび病菌の DNA 量を経時的に測定し、かび毒産生量との関係を調べた。

ウ　研究結果

(ｱ) 小麦の赤かび病抵抗性反応の観察

罹病穂の切片を作製し顕微鏡下で観察した結果、外穎、内穎の表皮に褐変がみられた部位では、内部柔組織が壊死を起こしており、壊死した細胞周辺ではいずれも菌糸が多数みられた（写真2515-1）。また葯や果皮にも菌の侵入、細胞の壊死がみられ、葯から頴および果皮に菌糸が移行・進展している様子が観察された。抵抗性品種では頴および果皮で菌の進展が比較的抑制されていた。

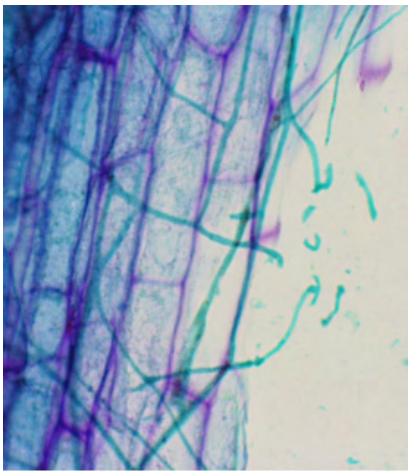


写真2515-1　罹病組織（内頴）の縦断切片
（品種　春よ恋）

(ｲ) 主要品種におけるかび毒産生量の調査

かび毒産生量は接種時期が早まるにつれて多くなり、供試した全ての品種で開花初期～開花盛期に最も高い値を示した。DON 産生量には品種間差がみられ、抵抗性品種「北見春65号」、「春よ恋」では他の品種よりも各接種時期で比較的低かった（表2515-1）。NIV 産生量は、各品種、接種時期ともに N. D.（≦50ppb）～74ppb の範囲であった。

(ｳ) 赤かび病菌感染によるかび毒産生量の経時的変化の調査

圃場試験では各品種とも接種 2 週間後には小穂に明確な病徴が認められ、その後、全ての品種で発病度は上昇した。麦粒中の DON は接種 1 週間後から全ての品種で検出された。全ての品種で接種 2 、 3 週間後に最も濃度が高く、 4 週間後にはやや低下した（図2515-1）。NIV は接種 2 週間後に全ての品種で検出されたが、いずれも DON の1/20以下であった。麦粒を除いた小穂中の DON についても調査した結果、麦粒の場合と同様に接種 1 週間後から検出され、 3 、 4 週間後に最も濃度が高かった。

(ｴ) 定量 PCR 法による赤かび病菌感染量の経時的変化の調査

麦粒および麦粒を除いた小穂中の赤かび病菌 H3株感染量の変化について定量 PCR 法により調べた結果、接種 1 週間後には供試した全ての品種で検出され、その後、急激に増加し、DON 産生量の変化とほぼ同じ傾向を示した（図2515-2）。

表2515-1　品種、接種時期と DON 産生量（ppm）

接種時期	開花初期	開花盛期	開花後期	無接種
品種名				
農林 61 号	8.61	4.23	0.86	0.18
春よ恋	3.65	3.99	0.59	0.13
春のあけぼの	7.37	4.79	0.85	N.D.
ハルユタカ	5.95	1.76	1.87	0.11
北見春 65 号	2.37	0.52	0.34	N.D.

1) N.D.≦ 0.1ppm

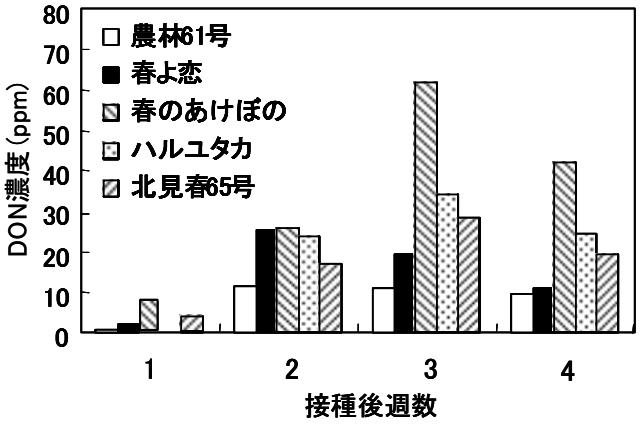


図2515-1　接種春まき小麦 5 品種における DON 濃度（麦粒）の推移（開花盛期接種）

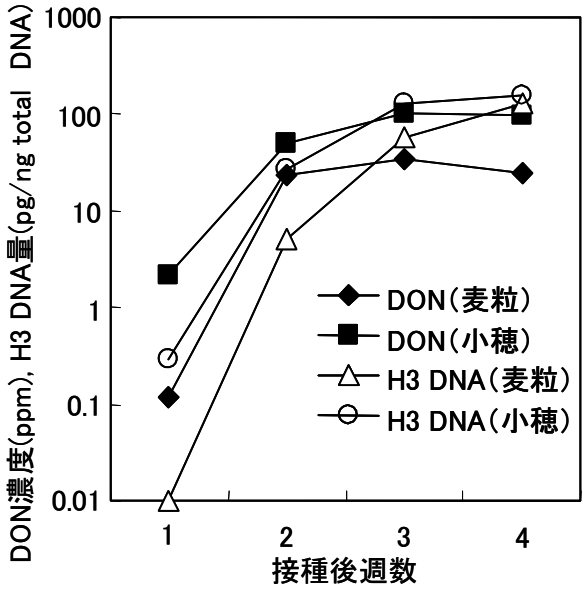


図2515-2　接種小麦中の DON 濃度と赤かび病菌 DNA 量の推移（品種 ハルユタカ）

エ　考　察

(ｱ) 小麦の赤かび病抵抗性反応の観察

赤かび病菌は開花期に葯や頴花に付着し、短時間で発芽・感染し、頴部に病徴を示す（坂 2002)。今回供試した品種においても、葯および頴部で赤かび病菌が多量に増殖・進展している様子が観察された。小麦の赤かび病抵抗性は主に菌の侵入に対する抵抗性（Type I)、および組織内での菌の進展に対する抵抗性（Type II）に分けられている（Schoroeder and Christensen 1963)。今回供試した抵抗性品種では頴および果皮で菌の侵入がみられるが、その進展が感受性品種に比べて抑制されているのが観察され（堀田ら 2006)、主に Type II の抵抗性を有していることが明らかとなった。

(ｲ) 主要品種におけるかび毒産生量の調査

今回供試した品種の中では、「北見春65号」、「春よ恋」でかび毒の産生量が少なく、比較的強い抵抗性を示した。しかし、開花初期～開花盛期に接種した場合、厚生労働省が示した基準値1.1ppm 以上の DON が産生されていた。赤かび病の品種抵抗性については不明な点も多いが、現在栽培されている品種ではかび毒の汚染を回避できる状況とは考え難く、今後、更に抵抗性系統の育種・選抜が必要と考えられた。

(ｳ) 赤かび病菌感染によるかび毒産生量の経時的変化の調査

かび毒は接種後、比較的早い時期から検出され、接種１～２週目に産生量が急激に増加し、その後、麦粒の登熟（乾物重の増加）が進むと共に頭打ちになることが明らかとなった。このことから、感染直後または感染初期に防除を徹底することにより、かび毒の産生が抑制され、また病徴の進展も抑制できると考えられた。

(ｴ) 定量 PCR 法による赤かび病菌感染量の経時的変化の調査

赤かび病菌の感染量は、上記で示したかび毒（DON）産生量の変化とほぼ同じ傾向を示したことから、感染後かなり早い段階で赤かび病菌が小穂内で急激に増殖し、それにともない DON が多量に産生されていると考えられた。かび毒の蓄積部位およびその蓄積機構については不明な点が多いが、赤かび病菌の植物内での増殖を抑制することによりかび毒の産生も同時に抑制できると推測された。

オ　今後の課題

(ｱ) 小麦の赤かび病抵抗性反応の観察

主要品種間では赤かび病菌に感染した小穂部の抵抗反応に違いがみられたため、穂軸等小穂以外の部分についても同様に調査する。

(ｲ) 主要品種におけるかび毒産生量の調査

人工接種では品種間および感染時期の違いによってかび毒産生量に明確な違いがみられたが、自然感染条件においても同様な結果が得られるか調査する。

(ｳ) 赤かび病菌感染によるかび毒産生量の経時的変化の調査

主要品種間では、かび毒産生量の経時的変化に違いがみられたため、かび毒の蓄積部位および蓄積機構の違いについて引き続き調査する。

(ｴ) 定量 PCR 法による赤かび病菌感染量の経時的変化の調査

赤かび病菌の感染量に対応してかび毒が小麦植物体内に蓄積していることが明らかになったことから（堀田ら 2005a、2005b)、植物内での赤かび病菌の量的変化に基づいて品種の抵抗性を評価する方法を検討する。

カ　要　約

北海道では赤かび病菌 *F. graminearum* による春まき小麦のカビ毒汚染が最も重要な問題となっているため（相馬・角野 2003)、北海道産主要品種を用いて赤かび病抵抗性反応およびかび毒産生機構の解明を行った。赤かび病菌は開花期に葯および頴部に感染し、その後、小穂内で増殖・進展している様子が観察された。かび毒は感染初期から検出され、小穂内での菌の急速な増殖に対応して麦粒等に多量に産生されていた。かび毒産生量は感染時期および品種間で差がみられ、抵抗性品種では頴および果皮で菌の進展を抑制することでかび毒の産生も抑制していることが推察された。

キ　引用文献

坂　智宏 2002. ムギ類赤かび病の生理・生態およびコムギの抵抗性. 植物防疫 56:58-63.

Edwards S. G., et al. 2001. Quantification of trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to determine efficacies of fungicides against fusarium head blight of winter wheat. Appl. Environ. Microbiol. 67:1575-1580.

北海道植物防疫協会 2004. コムギの病害. 北海道

病害虫防除提要．123-139.

堀田光生・中山尊登・島貫忠幸2005a．Competitive PCR を用いたコムギ赤かび病菌の定量法の検討．日本植物病理学会報 71:81.

堀田光生・中山尊登・島貫忠幸2005b．コムギ赤かび病菌の植物内での動態とマイコトキシン蓄積量との関係．日本植物病理学会報 71:226.

堀田光生・加来久敏・中山尊登 2006．北海道産春まきコムギの麦穂中における赤かび病菌の動態と抵抗反応の組織学的観察．平成18年度日本植物病理学会大会講演要旨集．62.

Schoroeder and Christensen 1963. Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. Phytopathology 53:831-838.

相馬　潤・角野晶大 2003．2001～2002年に北海道の春まきコムギから分離された赤かび病菌のデオキシニバレノール産生能．北日本病虫研報 54:38-40.

研究担当者（堀田光生*、島貫忠幸、中山尊登）

16　麦類における赤かび病かび毒蓄積様式の解明

ア　研究目的

近年重要問題となっている赤かび病かび毒汚染の低減には、従来の赤かび病防除技術では効果が十分ではなく、新たな防除技術の構築が必要となっている。そこで本研究では、オオムギおよびコムギにおけるかび毒汚染低減技術構築に資する基礎的知見を得るため、感染時期と穀粒中かび毒蓄積量との関係および登熟期間中のかび毒蓄積様式を明らかにする。なお、西日本においては、従来から重要視されているデオキシニバレノール（DON）とは毒性が異なるニバレノール（NIV）を培地上で DON より多く産生する菌株（NIV 産生型菌株）が優占して分布することから、試験研究用の NIV 産生型菌株を新たに選定し、DON・NIV を対象とした解析を行う。

イ　研究方法

(ア) NIV 産生型試験研究用菌株の選定

2002年に西日本で分離され、米培地における NIV/DON 産生比が比較的高かった赤かび病菌 *Fusarium graminearum* Schwabe（*F. graminearum* 種複合体）9 菌株について、下記諸性質を調査した。

a　マングビーン液体培地における胞子形成能

上記の NIV 産生型菌 9 菌株と、対照として、我が国で品種抵抗性の研究（吉田ら　2003，黒田・鈴木 2006）に用いられている DON 産生型菌である'H3'菌株（MAFF 101551）および DON 産生型であるが米培地におけるゼアラレノン（ZEA）産生量が特に多かった 1 菌株（'ZEA1'菌株）を選び供試した。濃度 10^6/ml に調整した各菌株の分生胞子懸濁液を、マングビーン液体培地100 ml あたり50 µl 接種し、25℃で 7 日間110 rpm で振盪培養し分生胞子を形成させた。その後培養液中の胞子濃度を測定した。試験は 3 反復で行った。

b　感染コムギ粒におけるかび毒産生性

米培地で NIV を産生した菌株が圃場で接種したコムギの穀粒中にも NIV を産生するかどうかを調べる目的で試験を行った。(ア) a と同じ11菌株を供試した。九州沖縄農業研究センター（熊本県合志市）の水田圃場（黒ボク火山灰土）にコムギ品種「チクゴイズミ」を2002年11月25日に播種し、慣行に従い栽培した。供試菌株は、(ア) a と同様の方法で分生胞子を形成させ、5×10^6/ml に胞子濃度を調整し Tween 20を0.2 ml/l 加え接種試験に用いた。接種は、小林ら（2001）がイネいもち病で開発した人工接種法を用いた。コムギの開花 7 日後の日没直前に55X60X110 cm の枠内の穂に、胞子懸濁液を 1 区あたり50 ml 噴霧接種し、直ちに農業用ポリエチレンフィルム（厚さ0.06 mm）で被覆することで結露を促し、翌朝6:30にフィルムを取り外した。対照区は蒸留水を50 ml 噴霧し、同様の処理を行った。接種後はスプリンクラー散水により発病を促した。成熟期に収穫し脱穀後、2.2 mm の縦目篩で選別した整粒について、DON・NIV・ZEA を液体クロマトグラフ質量分析で検出定量した。

c　麦類における病原力

前述の11菌株を供試した。圃場で栽培したコムギ「チクゴイズミ」およびオオムギ「イチバンボシ」を2003年 3 月15日に1/5000 a ワグネルポットに鉢上げし、その後ビニールハウスで育成した。各菌株の培養と胞子濃度の調整は前述の方法と同様に行った。開花期に開花が揃った穂を 1 ポットあたり 5－8 穂残して他は切除し、開花 4 日後に 1 ポットあたり 20 ml の各菌株の胞子懸濁液を噴霧接種した。接種後は細霧ハウスに静置し発病を促し、オオムギは接種 6 日後、コムギは接種 8 日後に各ポットの罹病スコア；0：穂の100%が健全－9:穂の100%が発病（吉田

ら　2003）を調査した。1菌株について3ポットを完全無作為に配置した。

（イ）麦類におけるかび毒蓄積様式の解明

感染時期のかび毒蓄積への影響、及び登熟期間における穀粒中の経時的なかび毒蓄積様式について解析するため、コムギ・オオムギについて、それぞれ抵抗性の異なる数品種を材料としてDON産生型菌・NIV 産生型菌の混合接種源を用いたポット接種試験を行った。

コムギについては、日本の普及品種で抵抗性中程度の「農林61号」、抵抗性弱の「Emblem」、抵抗性強の「蘇麦3号」、「Frontana」、「延岡坊主小麦」を材料とした。材料は、6号硬質ポリエチレンポット（18 cm径）に1鉢あたり5－6個体植えとし、ビニールハウスで育成した。各品種の出穂期に1ポットあたり6-10穂残し他は切除して、ステージの揃った穂を接種試験に供試した。接種源は、DON産生型の’H3’菌株と、本課題で選定したNIV産生型の’NIV2’菌株の分生胞子を等量混合し、5×10^6/ml に胞子濃度を調整しTween 20を0.2 ml/l加えたものを用いた。処理区は、接種時期を開花期、開花10日後、開花20日後、収穫時期を開花10日後、開花20日後、成熟期（コムギでは開花38-40日後）とし、全部で6処理区とした。各品種について、1処理区あたり3ポットを完全無作為に配置した。

各処理区の接種時期に、1ポットあたり20 mlの接種源を噴霧接種し、細霧装置を設置した網室に6日間静置し発病を促し、その後、雨よけハウス内で各処理区の収穫時期まで登熟させた。接種したコムギの発病調査は、開花20日後に行った。（なお、開花20日後以降は穂自体が登熟により黄色みを帯びてくるため病徴が見えにくくなった。）発病程度は、各穂について、発病して変色した面積に応じ0-100（0:病徴なし、5：1小穂の一部が発病、10:1小穂全体、または穂全体の10%までが発病、20-90:それぞれ穂全体の20-90%程度までが発病 100:穂全体の95%以上が発病）で評価し、各ポットの平均値を算出した。各処理区の収穫時期に、ポット毎に全ての穂を収穫し、70℃で1日乾燥させた後に脱穀した。脱穀の際は、小型脱穀機の吹き出し口にネットを取り付け、発病等により軽くなった粒が失われないようにした。各ポットから得られたサンプルについて、脱色しシワになった粒を被害粒として被害粒率（%）を調査し、その後DON・NIVを（株）協和メデックス社の酵素抗体法（ELISA法）により定量した。

オオムギについては、二条閉花性で抵抗性強の「ニシノチカラ」、「露6号」、六条開花性の「ミノリムギ」（抵抗性弱）、「Chevron」（抵抗性中）、「イチバンボシ」「サヌキハダカ」（抵抗性中～やや弱、裸麦）を材料とし、コムギと同様の試験を行った。なおオオムギでは、成熟期は開花期の33-35日後であった。

ウ　研究結果

（ア）NIV産生型試験研究用菌株の選定

各菌株のマングビーン培地中の胞子形成能は、いずれも’H3’菌株より低かった（1/10-2/3程度）が、接種試験に使用可能なレベルであった（データ略）。感染コムギ粒におけるかび毒産生性を調べるための圃場接種試験では、対照区でも散水処理により自然感染が促進されDON・NIVの汚染が確認されたが、NIV 産生型菌株の接種によるNIV 蓄積量の増加が確認され（図2516-1）、米培地でNIV産生型と判定された菌株は圃場試験で接種したコムギの穀粒においてもNIVを産生することが示された。一方、接種試験区におけるZEAの産生はほとんど認められなかった（図2616-1）。病原力を調べるためのポット試験では、9菌株供試したNIV 産生型菌株のうち、’NIV2’菌株は’H3’菌株より接種コムギの発病度が低くなりオオムギではほぼ同等であったが、残りの8菌株はオオムギおよびコムギのいずれにおいても’H3’菌株よりも発病度が有意に高かった（図2516-2）。以上の結果から、胞子形成能が比較的高く病原力の異なる2菌株、すなわち病原力の強い’NIV1’菌株と病原力の弱い’NIV2’菌株を、NIV 産生型の試験研究用菌株として選定した。

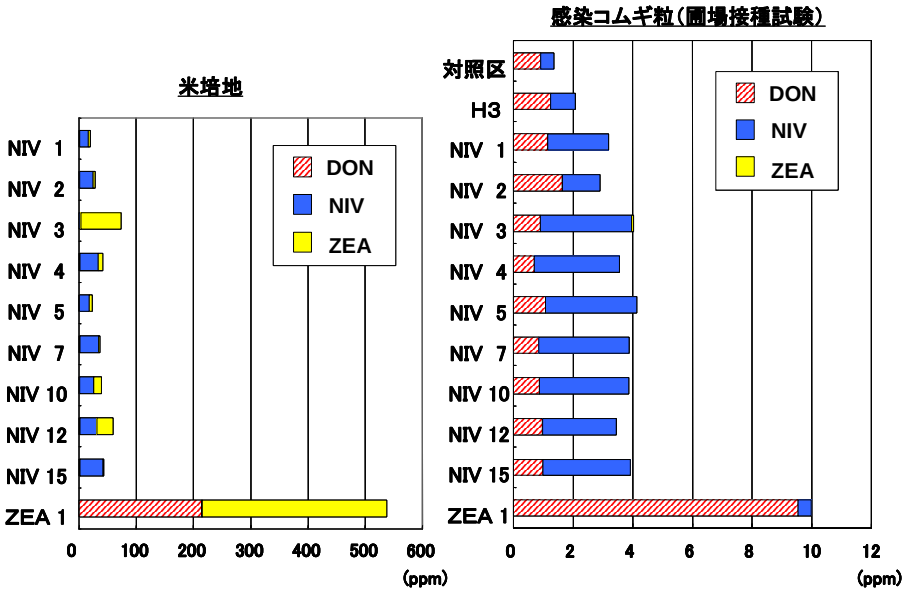


図2516-1　各菌株の米培地および感染コムギ粒におけるかび毒産性

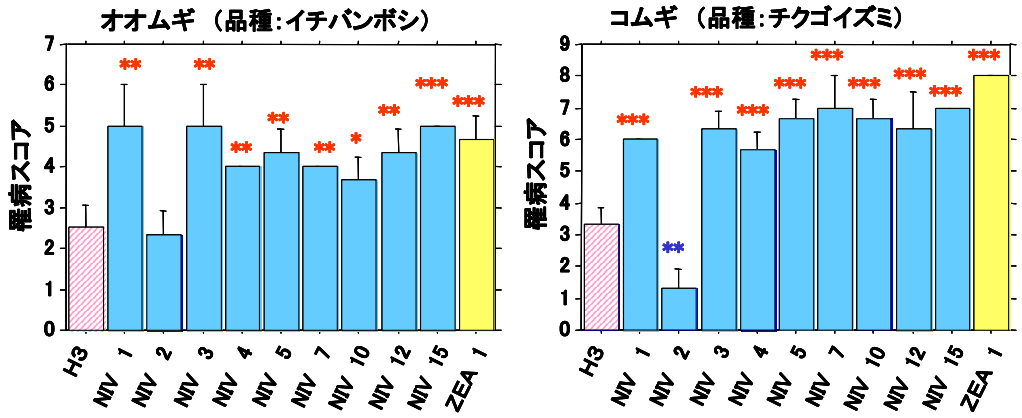


図2516-2　ポット接種試験による菌株間の病原力比較

注）*、**、***はそれぞれ’H3’菌株と５％、１％、0.1%水準で有意差あり。

(ｲ) 麦類におけるかび毒蓄積様式の解明

コムギでは、品種により DON・NIV の蓄積レベルは大きく異なるものの、粒当蓄積量はいずれの品種も共通して開花20日後以降に大きく増加した（図2516-3：「農林61号」のデータのみ抜粋)。また感染時期の影響については、いずれの品種でも、開花期以降感染時期が遅くなるにつれ穂の発病度は大幅に低下したが、成熟後の被害粒率やかび毒蓄積量は、感染時期が遅くなっても穂の発病度ほどには低下しない傾向が認められた（図2516-4)。特に「農林61号」では、開花20日後の感染で穂の発病が判然としなかったにもかかわらず、成熟期収穫物に高濃度のかび毒が蓄積していた（図2516-4)。このことは、かび毒蓄積には開花期頃の感染だけでなく、登熟後期の感染も重要であることを示す。ただし、感染時期の遅れに伴う穂の発病度の低下程度と成熟後の被害粒率およびかび毒蓄積量の低下程度との差異は、抵抗性強の品種では小さい傾向があった（図2516-4)。

コムギでは開花20日後以降に毒素の大幅な増加が見られたのに対して、オオムギでは、より早い時期から毒素が増加する傾向が見られた（データ略)。また、オオムギにおける感染時期の発病およびかび毒蓄積への影響は、品種により異なり、抵抗性強の二条品種では、開花期よりも後期の感染が発病およびかび毒蓄積に重要であることが示唆された（図2516-5)。さらに、コムギと同様オオムギでも、開花20日後の感染で穂の発病が判然としない場合にも、収穫物には高濃度のかび毒が蓄積し得ることが示された（図2516-5)。

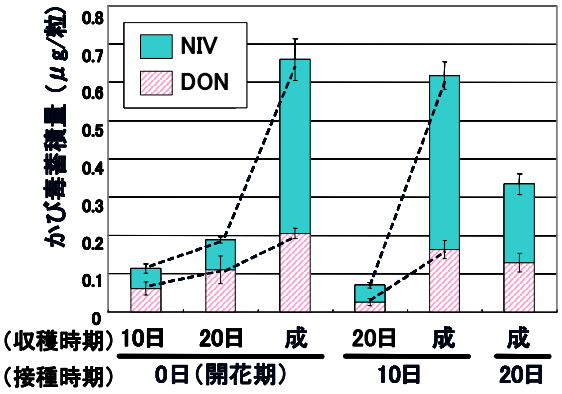


図2516-3　コムギ穀粒におけるかび毒蓄積様式（品種：「農林61号」）

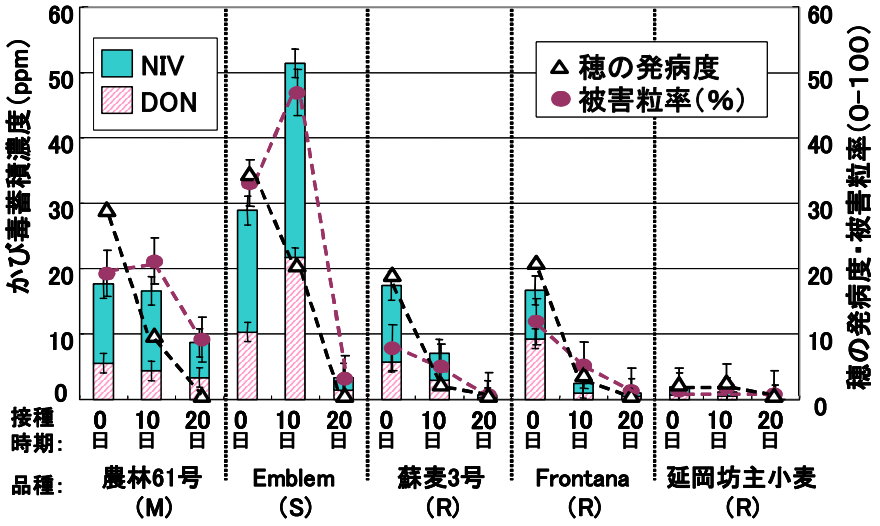


図2516-4　感染時期がコムギの発病、被害粒率およびかび毒蓄積に及ぼす影響

注）「～日」：開花後日数。R，M，S：それぞれ抵抗性強、中、弱品種。なお被害粒率およびかび毒蓄積濃度は成熟期収穫物のものであるのに対し、穂の発病度は開花20日後のスコアである。

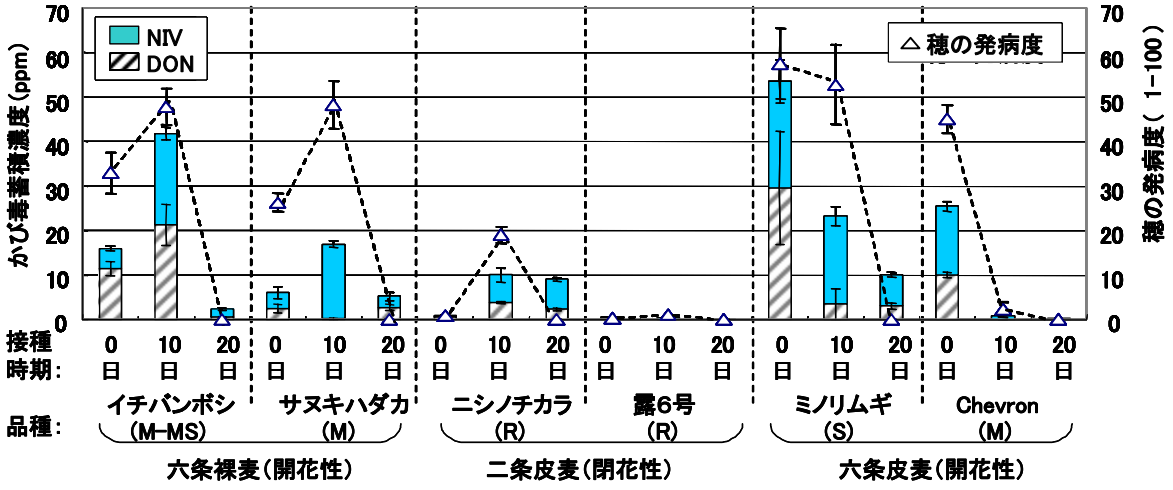


図2516-5　感染時期がオオムギの発病およびかび毒蓄積に及ぼす影響

注）R，M，MS，S：それぞれ抵抗性強、中、やや弱、弱品種。他、前図と同様。

エ　考　察

コムギでは開花期が最も赤かび病に弱く、赤かび病の防除は開花期の薬剤散布が重要とされているが、本研究の結果から、コムギでは登熟期間後半に、1）既感染菌によるかび毒蓄積量の大幅な増加と2）新たな感染によるかび毒蓄積が起こることがわかり、かび毒汚染低減には開花期に加えて登熟後期の防除も重要であることが示唆された。また、オオムギでもコムギと同様に開花期（閉花性の品種では、ほぼ穂揃い期に相当）の防除が重要とされているが、本研究の結果から、発病およびかび毒蓄積に重要な時期は品種により異なり、抵抗性強の二条品種では開花期よりも後期の感染が重要であることが示唆された。よってオオムギでは品種特性に応じて防除時期を再検討する必要があると考えられる。さらに、コムギ・オオムギのいずれにおいても、登熟後期の感染により、穂の発病が確認されない場合にも穀粒中に毒素が高濃度に蓄積するリスクがあることが示された。ただし後期感染によるかび毒汚染リスクは品種により異なると考えられ、品種のかび毒蓄積性を正確に評価するには、開花期頃の感染だけでなく、より後期の感染も考慮する必要があると考えられた。加えて、今回 NIV 産生型菌株の諸性質を調査した副次的成果として、米培地で ZEA を産生する菌株が、感染コムギ粒において必ずしも ZEA を蓄積しないことが明らかになった。このことから、DON・NIV とは構造および毒性が全く異なるかび毒である ZEA については、感染ムギ粒における蓄積条件が DON・NIV とは大きく異なることが示唆され、今後、感染ムギ粒における ZEA 蓄積条件を検討する必要があると考えられた。

オ　今後の課題

本研究から、かび毒汚染を低減するには、コムギでは開花期に加え登熟後期の防除も重要であること、オオムギでは、抵抗性強の二条品種では開花期よりも後期の防除が重要であることが示唆されたが、これらを実証する試験を年次を重ねて行いその有効性を検討する必要がある。また、今回得られた結果はいずれも単年度の試験結果であり、品種のかび毒蓄積特性をより正確に評価するには、さらに年次を重ねて試験を行う必要がある。

カ　要　約

西日本で分離された赤かび病菌株について諸性質を調査した結果から、NIV 産生型試験研究用菌株として、病原力の異なる 2 菌株を選定した。そのうちの 1 菌株と既存の DON 産生型試験研究用菌株とを混合した接種源を用いた試験により、麦類における赤かび病感染時期のかび毒蓄積への影響、また登熟期間における穀粒中の経時的なかび毒蓄積様式について、DON・NIV を対象に解析した。その結果、コムギでは、登熟期間後半に、既感染菌による DON・NIV 蓄積量の大幅な増加と新たな感染による DON・NIV の蓄積が起こることがわかり、かび毒汚染低減には、開花期に加えて登熟後期の防除も重要であることが示唆された。またオオムギでは、抵抗性強の二条品種では開花期よりも後期の感染が毒素蓄積には重要であることが示唆され、防除時期を再検討する必要があると考えられた。さらに、コムギ・オオムギのいずれにおいても、登熟後期の感染により、穂の発病が確認されない場合にも穀粒中に毒素が高濃度に蓄積するリスクがあることが示された。ただし後期感染による毒素汚染リスクは品種により異なると考えられた。

キ　引用文献

小林隆・中島隆・濱崎孝弘・石黒潔　2001. 透明被覆資材を用いた圃場におけるイネいもち病菌の人工接種法. 北日本病虫研報. 52:21-23.

黒田克利・鈴木啓史　2006. 三重県で栽培されているコムギ品種の赤かび病抵抗性. 関西病虫研報. 48:45-47.

吉田めぐみ・河田尚之・塔野岡卓司　2003.「ポット検定」法による大麦の高精度赤かび病抵抗性検定. 作物研究所研究報告. 3:1-19.

研究担当者（吉田めぐみ*、荒井治喜、中島隆）

第３編　世界的に信頼される分析データ提供システム等の基盤構築

第１章　国際基準に則った食品の安全性保証システムの構築

１　かび毒分析における分析精度とその要因に関する検討

ア　研究目的

食品の安全性を確保するためにはGAP、GMP、GHPあるいはHACCPといった、生産から消費に至るまでの各過程での取り扱いの改善が有力な手段として知られ、2005年秋にはISO22000食品安全マネジメントシステムが、ISO9000のマネジメントシステムに、HACCP の考え方を組み込む形でで動き出している。一方、一度生産されたもの、あるいはその原材料中の有害物に対しては正確な分析とそれに基づいた規制が必要されている。この食品の安全性を担保するための両輪（安全な食品を作るためのシステムと、食品の安全性を検証してゆくシステム）のいずれがかけても食品の安全性にとっては大きな脅威となる。しかしながら積極的にものを作り出すという側面の少ない後者は、社会的にはあまり評価されずに置かれがちである。

本研究では、期間の前半においては食品の安全性に関わる分析法の性能に関わるいくつかの事項を検証し、さらに後半ではその上にたって、これまでの安全性に関わる分析法の多くが欧米主力でその開発が進められてきた結果、世界の主要な穀類の中では分析法の検討が遅れている「コメ」を対象に、既存の他の穀類に対して妥当性確認（バリデーション）されている分析法を、AOAC インターナショナルオフィシャルメソッドボード（AOAC－OMB）での合意に沿う形で、シングルラボバリデーションによりマトリックスの拡大（ムギ等からコメへ）を行い、その際の問題点の抽出を行い、今後の広範な検討の基礎とする。

イ　研究方法

(ｱ) マイコトキシン分析における方法の変化と真度

WHO が行ったチェックサンプル試験プログラムおよび英国中央科学研究所（CSL）が運営しているFAPAS における、過去25年間のプロフィシエンシィテスティング（PT：技能試験、外部精度管理）のデータ中から、トウモロコシ及びピーナツ中のアフラトキシン B_1、粉乳中のアフラトキシン M_1および小麦粉中のオクラトキシン A の結果を抽出し、その間の分析法の変化と、結果を z スコアで評価したときの真度の変化について、計算方法を統一して比較検討した。

(ｲ) ルブラトキシン B をモデルとしての酵素抗体法と HPLC 法との比較

強い肝毒性を持ちながらあまりその実態が判明していない一部のペニシリウム属菌が産生するマイコトキシンであるルブラトキシン B（RB）をモデル物質として用い、ウサギによりポリクローナル抗体を作製し、その抗体を用いた酵素抗体法（ELISA）法と、紫外吸収検出高速液体クロマトグラフによる分析の二つの方法の精度等の比較を行った。

(ｳ) ムギ中のオクラトキシン A 分析法のコメへの適用拡大

広範な穀類あるいは嗜好品等を汚染し、特に欧州において厳しい規制がひかれている、一部アスペルギルス及びペニシリウム属菌が産生する腎毒性、発がん性を持つマイコトキシンであるオクラトキシン A（OA）の、コメでの実態把握に使用できる分析法を検討した。検討には、すでにムギ等を対象マトリックスとして、分析法の妥当性確認が完了している方法を、AOAC-OMB の合意に沿う形で、シングルラボバリデーション（SLV）により試験法の妥当性確認を行った。

またこの試験に先立って、試料の粉砕に用いる粉砕器、サブサンプリングの条件に関しても若干の検討を行った。

ウ　研究結果

(ｱ) マイコトキシン分析における方法の変化と真度

WHO が行ったチェックサンプル試験プログラム（1978年、1989年）、英国 CSL による FAPAS（アフラトキシン B_1および M_1：2002年、オクラトキシン A：2003年）による PT の結果を、FAPAS が通常使用している統計解析手法により、WHO 実施分を再計算

し比較検討をした。また同時に付属の情報から、使用されている分析方法に関しての部分を抽出比較検討した。

その結果、分析方法は図3101－1に示したように、いずれマイコトキシンの分析においても、検出法の主力が薄層クロマトグラフ（TLC）による方法から、高速液体クロマトグラフ（HPLC）による方法に変化していったことが示された。またこの間において、一時発展するかに見えた、酵素抗体法（ELISA）による定量法は、一定の支持は得られたもののこの間に急速にのびた HPLC のような支持は得られていなかった。

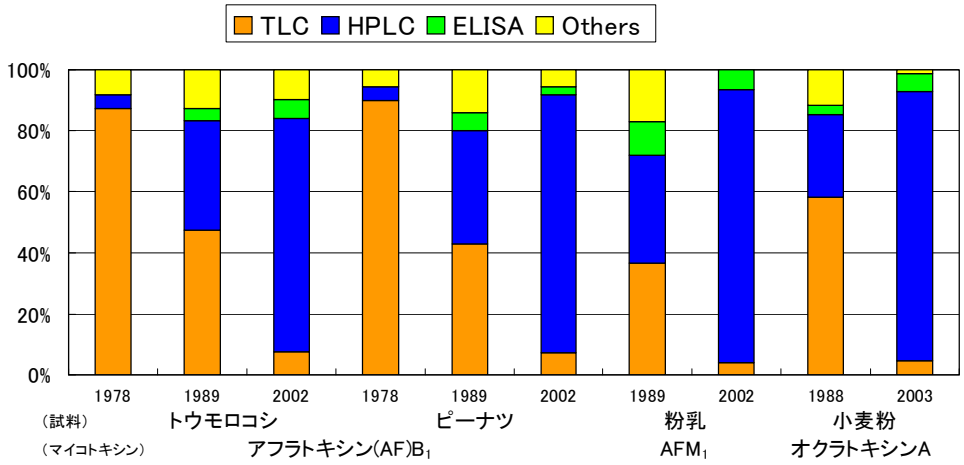


図3101-1　マイコトキシンの分析法の変化

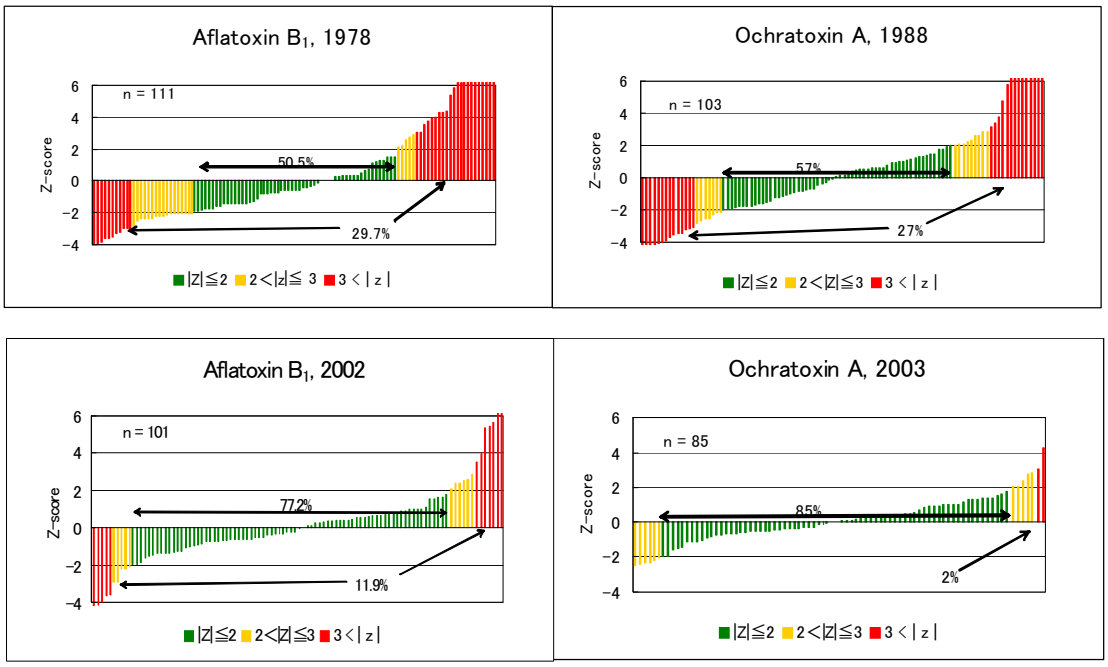


図3101-2　z スコアで評価した分析法の精度の変化

またこの間における分析の真度の変化を、PT でその結果の評価に通常用いる z スコアにより比較をした。その結果は図3101-2に示したとおり、いずれの分析法においても|z|が2以下（PT においては満足な結果とする）に入る機関の数が大幅に増え、分析の真度が向上していることが示されていた。またアフラトキシン B_1 におけるデータを見ると、TLC による結果よりも HPLC による結果の方がやや満足の割合が高かったが、けっして TLC であるから不満足な結果しか得られないということにはならなかった。

（イ）ルブラトキシン B をモデルとしての酵素抗体法と HPLC 法との比較

ルブラトキシンBのELISA分析のための抗体は、卵白アルブミンにRBを化学的に結合した人工抗原を白色和兎に接種することで作製した。測定系は、得られた血清を希釈し96穴マイクロプレートに直接コーティングし、RBを結合下、西洋わさびパーオキシデーズと試料中のRBの競合による、直接競合酵素抗体法により構築した。

その結果、得られた抗体は、試料溶液として、50%メタノールあるいは10%アセトニトリルを用いても測定可能である、耐溶媒性の優れた抗体であることが分かり、0.1 μg/mLから100 μg/mLの濃度範囲で測定可能であることが分かった。

高速液体クロマトグラフによるRBの分析は、C18カラムを用いた逆相条件で、水ーアセトニトリルの混合液を移動相とし、アセトニトリル濃度によるグラジエントをかけることによりほぼ満足するクロマトグラム（図3101-3）が得られた。この方法による定量限界は10 ngであった。

(ウ) ムギ中のオクラトキシンA分析法のコメへの適用拡大

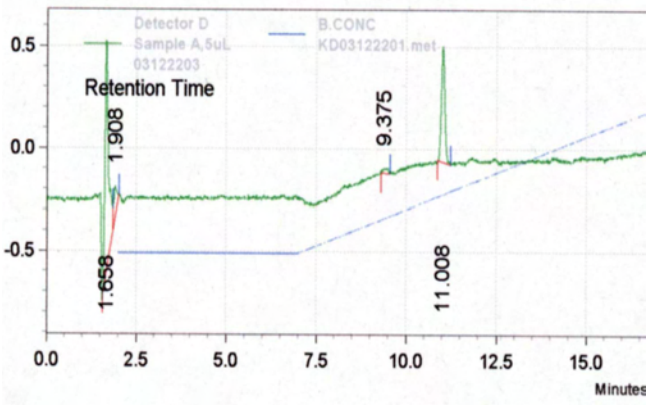


図3101-3 ルブラトキシンBのクロマトグラム

試料調製時に使用する粉砕器によるサンプリングに関しては、粉砕後均質化しさらにそれを縮分器により分けてサブサンプルを取る方法が多く用いられている。しかし、この方法では、粉砕した試料を扱う時間が長くなり、試料の飛散とそれによる環境汚染や実験者の被爆の機会も多くなる。そのため、試料の粉砕とサブサンプルの作製を同時に行うことの出来るサブサンプリングミルが市販され、欧米では普及している。今回は、3つの吐出口を持つ（3つのサブサンプルが同時に得られる）装置を用いてその吐出口間での均一性を確認した（表3101-1）。その結果、3つの吐出口間では吐出量には大きな違いはあるものの、得られた試料の内容はかなり均一であり、吐出口間での有意差は見られないという結果であった。

小麦中のOAの分析法としては、いくつかのもが知られているが、今回は、多機能精製カラム（MFC）を用いた前処理による方法と、抗体を結合したカラム（IAC）を用いて前処理をする方法を検討した。その結果、MFCを用いる方法は、回収率、HPLC分析におけるOA付近での妨害では問題がなく、操作性もIACより優れていた。しかし、今回用いたHPLCの条件（C18逆相カラムとアセトニトリルー酢酸の移動相）では、分析開始後2.5から3時間付近に大きなピークが現れ、分析時間が長くなり過ぎ実質的にHPLCの分析が困難であることが判明した。IACによる前処理ではこのような現象は生じなかった。このため、精製にはIACを用いることとした。

次に、IACを用いる方法に関して、抽出条件を含めて検討し、以下の条件でSLVを行った（表3101-2）。

表3101-1 サブサンプルミルによる粉砕試料の分析値（N=5））

	吐出量(g)	分析値（任意単位）	RSD(%)
吐出口1	204	10415	4.03
吐出口2	123	10029	4.33
吐出口3	136	9711	6.03
残余サンプル混合物	(313)	9800	1.93

試料は健全粒のトウモロコシに1%のかび汚染粒を混ぜたもの500 g

表3101-2　コメ中のオクラトキシンAのSLV条件

抽出条件：試料：25.0g、
溶媒：アセトニトリル／水(3/2, v/v)、100mL
方法：シェーカーで15分振とう抽出
精製：イムノアフィニティーカラムに抽出液をPBSで12倍に希釈(4mL+44mLl)したものを負荷、PBS(5mL)、水(10ml)で洗浄、メタノール(4mL)でOAを溶離、IAC溶出液をN_2ガス下で乾固、メタノール/水/酢酸(30/70/1, v/v/v)1mLに溶解
分析：逆相HPLC（Inertsil ODS-2, 4.6 x 250mm)
移動相：アセトニトリル/水/酢酸(500/500/1, v/v/v)、1mL/min
アルカリ溶液：0.1mol/L NaOH水溶液、0.3ml/min
励起波長:385nm、蛍光波長：444nm
試料：うるち米（白米、玄米)、餅米（白米)、インディカ米（玄米）

その結果、OAのHPLCによる検量線は0.01 ngから2ng の範囲で直線であり（R^2=0.999)、0.5 μg/kgのOAを各々の試料に添加して行った回収試験(いずれも6回の繰り返し）での日内差は RSD で5.7～16.7％、その時の平均回収率は82.6～110.2％、5 μg/kg では各々3.7～8.4%と75.4～94.0%、同じく日間変動は、0.5 μg/kg では、3.5～11.2%で82.4～99.6%、5 μg/kg では3.6～4.8%で、92.3～102.9%であった。

エ　考　察

(ｱ) マイコトキシン分析における方法の変化と真度

マイコトキシンの分析において、ここ4半世紀の間に分析者においてその真度に関しての認識が高まり、その真度が大幅に向上してきていることが明らかとなった。しかしながら、μg/kgオーダーの分析であり、時に大きなzスコアが出ることもある。この原因としては分析法自体の問題もあるが、サンプル調製等複雑な問題があり、今後さらに検討を進めなくてはならない点がある。またELISAに関しては、マイクロプレートを用いて行う方法で定量は可能であるが、定量精度に問題が残っていることと、欧州を中心にIACにより精製した試料をHPLC等により定量する方法が標準化されていることもあって、利用が限られた範囲にとどまっているように見られる。

(ｲ) ルブラトキシンBをモデルとしての酵素抗体法とHPLC法との比較

ルブラトキシンBをモデルにして行った実験では、ELISAとHPLCの間に、その感度、精度に大きな差はないことが確認された。しかしELISAにおいては、抽出に使用できる溶媒に制限があり、それが分析上のネックになることも確認された。この点は、環境問題により含塩素溶媒の使用が制限される現状においては、HPLC等の機器分析においても大きな問題となる可能性がある。

(ｳ) ムギ中のオクラトキシンA分析法のコメへの適用拡大

マイコトキシンの関する研究が欧米主導で行われてきていることもあり、穀類に対応する分析法はそのほとんどが、麦類とトウモロコシを対象としており、コメを対象としたものは皆無といえる状況にある。今回、麦類（小麦、大麦、ライ麦）に適用されている方法が、そのままではコメに対応できないことが確認された（MFC）が、これは同じ穀類といいながら、米とムギの間には成分的な違いがあることを示すものであり、今後より多くの分析法開発の努力をコメに割かなくてはならない可能性を示唆するものであった。

オ　今後の課題

(ｱ) 分析の精度を向上していくには、試験方法の開発と並んで、種々の精度管理が必要であり、より実際的なPT（コメを試料としたものなど）が必要である。

(ｲ) コメをマトリックスとした分析法が国際的にはほとんどない中で、国民の食料の安全性確保の面からも、コメを対象マトリックスとした種々の有害物質に対する分析法の開発と妥当性確認が必要である。

(ｳ) 分析の信頼性を向上させるために、試料調製（サンプル調製）に関してより厳密な検討が必要で

ある。

カ　要　約

食飼料を汚染するマイコトキシンの分析精度はここ四半世紀の間に大幅に向上し、その間に分析法の主力は TLC から HPLC へと変化してきた。

ELISA 分析は、制限はあるもののマイコトキシンの分析法として充分に使用できる可能性を持つものである。

コメに関しての分析法の適用範囲拡大（マトリックスエクステンション）にあたっては、コメと他の穀類の間には成分的に違いがあることをふまえて十分な検討をする必要がある。

キ　引用文献

Yoshiro Honma, Shigeru Naito, Amanda Earnshaw, Hitoshi Nagashima, Tetsuhisa Goto, 2004, Progress in the accuracy of mycotoxin anaysis in the last quarter centry, *Mycotoxins*, 54, 33-38

本間吉朗、後藤哲久、2006、サンプリングミル（Romer シリーズ II）による試料調製、月刊フードケミカル、2006-7, 86-88

Tetsuhisa Goto, Krishan D. Sharma, Hitoshi Nagashina, 2004, Development of enzyme sorbent immunoassay for rubratoxin B, Ed by Takumi Yoshizawa, New Horizon of Mycotoxicology for Assuring Food Safety, Japanese Association of Mycotoxicology, 289-293

研究担当者（後藤哲久*）

2　マイコトキシン分析の信頼性確保のための外部精度管理システムの開発

ア　研究目的

食品汚染化学物質や残留農薬濃度の測定は、それら化学物質等のヒト体内への摂取による健康への影響についてリスク評価を行ううえで極めて重要である。したがって、我々が日常摂取する食品中の汚染化学物質の高度な検査技術の維持あるいは分析結果の信頼性の確保は検査機関としての必須の要件であり、また日頃からの自主点検として内部精度管理の実施や他検査機関との精度比較により検査結果が担保されるものと考えられる。

本研究では、代表的穀物汚染カビの一種である赤カビが産生するマイコトキシン〔デオキシニバレノール（DON）およびニバレノール（NIV)〕の汚染分析を実施している各検査機関の精度管理調査を実施することを目的とし、（独）食品総合研究所の協力下、これらの検査機関を対象とした外部精度管理調査を実施する。

イ　研究方法

(ｱ) 外部精度管理調査

汚染小麦と非汚染小麦を混合することによって設定濃度となるように作製した小麦調査試料を用い、外部精度管理調査を実施した。すなわち、作製した調査試料を参加機関に送付し、これについて各参加機関で実施した n=1の結果を返送してもらい、統計学的な解析を行った。なお、調査は年 2 回の実施とし、ともに検査対象は DON および NIV（2003年度第 1 回は DON のみ）とした。

(ｲ) 検査方法等に関する調査

外部精度管理調査に参加した検査機関に対し、検査結果の報告と併せて検査方法等についてアンケート調査を実施した。

(ｳ) 評価方法の検討

外部精度管理調査において一般的に用いられている平均値と標準偏差を用いた z-スコア、メジアンと正規四分位数範囲を用いたロバスト法、Horwitz 式を用いた解析の 3 種を用いて、それぞれにおける限界外を示すデータ数の解析を行った。また、同年度で実施した 2 回の検査結果の相関性ならびに経験年数との相関性についても併せて観察した。

ウ　研究結果

(ｱ) 外部精度管理調査における結果

2003年度より2005年度までの 3 年間にわたって DON ならびに NIV の検査を実施している検査機関を対象とした外部精度管理調査を全 6 回行ったが、その際の結果返送機関数の変遷は図3102-1に示した。各参加機関において採用している手法は ELISA 法、液体クロマトグラフ法およびガスクロマトグラフ法であった。またそれぞれの外部精度管理調査結果は表3102-1のとおりであったが、変動係数はほとんどの実施回において25%以下であり、HorRat 値も1.0に近似していた。採用手法ごとに解析結果を比較すると、ELISA 法による測定結果は他の機器分析による測定結果よりも大きな変動係数が得られる傾向が認められた。2004年度の第 1 回調査では明らかな異常値が存在したが、これは計算ミスによるものであった。さらに2004年度には 2 シグマ処理により除外さ

れた機関も存在したが、その理由を経過記録書から特定するには至らなかった。それぞれの参加機関について経年的な z スコアを観察すると、全ての外部精度管理調査実施回において z スコアの絶対値が 2 を超えた機関は認められなかったことから、特定の機関のみで検査技能が劣ることはないと判断された。

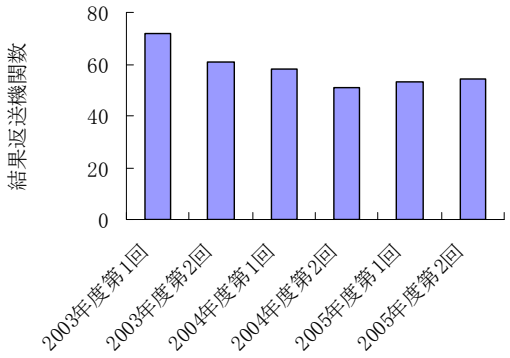


図3102-1　結果返送機関数の変遷

表3102-1　DON および NIV 検査における外部精度管理調査結果

年度			平均±標準偏差	変動係数(%)
2003	1回	DON	1.69±0.25	15
	2回	DON	1.37±0.29	21
		NIV	0.70±0.19	27
2004	1回	DON	0.65±0.24	37
	2シグマ		0.63±0.14	22
		NIV	0.47±0.12	25
	2回	DON	0.78±0.12	16
		NIV	0.56±0.26	47
	2シグマ		0.50±0.08	15
2005	1回	DON	0.90±0.19	21
		NIV	0.39±0.08	20
	2回	DON	1.22±0.23	19
		NIV	0.37±0.12	31

(ｲ) 各種統計解析手法を採用した場合の外部精度管理調査結果

返送された結果に明らかな異常値が認められた2004年度のデータを用い、各種統計解析手法を用いた際の z スコアについて比較検討したところ、平均値と標準偏差を用いた従来法と比較して、ロバスト法ならびに Horwitz 式による解析でより多くの限界外機関を発生させた（表3102-2)。さらに2005年度の結果を用いて報告値と検査に携わった経験年数との相関性の有無について解析したところ、経験年数の増加によっても明らかな検査精度の上昇は認められなかった（図3102-2)。

表3102-2　2004年度外部精度管理調査における統計解析手法別限界外データ数

	統計解析手法	DON	NIV
第1回調査試料	従来法	1(4)	2
	ロバスト法	9	3
	Horwitz式	8	3
	ｽﾐﾙﾉﾌの棄却検定	3	1
第2回調査試料	従来法	1	1(2)
	ロバスト法	3	4
	Horwitz式	3	2
	ｽﾐﾙﾉﾌの棄却検定	2	2

括弧内の数字は 2 シグマ処理時の棄却データ数を示す。

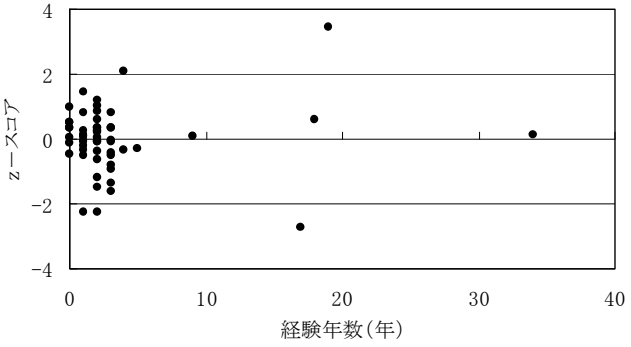


図3102-2　DON 検査の z-スコアと経験年数の相関性

エ　考　察

(ア) 外部精度管理調査結果

3 年間にわたり年 2 回のデオキシニバレノール検査およびニバレノール検査を対象とした外部精度管理調査を行ったところ、一部平均値から離れた機関が認められたものの全体的に比較的精度良く検査が実施されているものと考えられた。また、ELISA 法は機器分析と比較すると変動係数が大きくなる傾向が認められているが、これは ELISA 法がスクリーニング法として用いられていることを考慮すると十分な検査精度が保たれていることが示唆された。また、作製した小麦試料は外部精度管理調査を実施するうえで、十分に評価に耐えうる試料であったと考えられた。

(イ) 外部精度管理調査結果の解析方法

従来法、ロバスト法および Horwitz 式を用いた方法の 3 種を用いた統計解析手法により外部精度管理調査結果を解析しそれぞれについて z-スコアを算出したところ、従来法で最も限界外機関数が少なくなった。従来法では実測値を用いて平均値および標準偏差を算出するため、各参加機関の現状を把握した状況において z-スコアを算出できるという利点があるが、検査成績の評価においては許容限界をどのように設定するのかについて検討を加える必要性を示唆した。さらに他の統計手法においてはとりわけロバスト法では従来法よりも許容範囲が狭くなる傾向があり、Horwitz 式による解析では予測値との比較となる。そのため検査方法そのものが有しているばらつきを考慮した評価方法を新たに検討する必要があるものと考えられた。

オ　今後の課題

(ア) 外部精度管理調査の実施およびその解析方法

外部精度管理調査は検査結果の信頼性確保において有用な手段となると考えられる。しかし単回の実施ではあくまでも特定の時期における検査機関の精度を示しているにすぎない。このことを考慮すると検査機関における信頼性確保のための外部精度管理調査は今後も継続的に実施する必要があるものと考えられる。また、これまでの調査結果の解析では平均値と標準偏差を用いた従来法により実施してきたが、国際基準を考慮したいわゆる FAPAS 法によるロバストな解析についても実施する必要がある。さらに、これまでに使用した小麦試料の内部精度管理用試料としての可能性についても検討を加える必要があるものと考えられた。

カ　要　約

(ア) デオキシニバレノール検査に関する外部精度管理調査

日本国内においてデオキシニバレノール検査およびニバレノール検査を実施している検査機関を対象とした外部精度管理調査を2003年度から2005年度までの 3 年間実施した。デオキシニバレノール検査において各参加機関で採用されている検査手法は ELISA 法、液体クロマトグラフ法およびガスクロマトグラフ法であった。一方、ニバレノール検査についてはほとんどの検査機関で機器分析を採用していた。また外部精度管理調査結果について解析したところ、ほとんどの実施において変動係数は25%を下回っており、かつ HorRat 値も1.0に近似することが多かった。すなわち外部精度管理調査結果は経験上推定されるばらつきと同程度であることが明らかとなった。さらにスクリーニング法として使用が許可されている ELISA 法は機器分析と比較して測定値のばらつきという観点では劣るものの、実際の検査の場におい

てもスクリーニング手法として十分な精度を有していることを確認した。以上のことから、デオキシニバレノール検査を実施している検査機関では、比較的精度良く検査が実施されていることが示唆された。

研究担当者（大島赴夫、福原克治、鈴木達也*）

3　国際データ共有によるカンピロバクター食中毒菌の迅速検知･種同定システムの開発

ア　研究目的

カンピロバクターは、国際的に問題となっている畜肉由来の主要な食中毒菌であり、その危害対策が重要視されている。現在、食中毒起因菌として *Campylobacter jejuni/coli* が重点的に研究されている。しかしながら、本菌は14種よりなり、そのうち12種が人に対して病原性を示す。すなわち非 *jejuni/coli* 種においても人畜共通感染症としての危害があるにも関わらず、その食品を介した健康危害・生態分布情報は極めて乏しい。カンピロバクターの危害対策にはヒト食中毒に限らず農畜産物環境にも対応可能な情報収集が必須であり、これらを含めた迅速検出同定手段の提供が必要である。特に我が国では食糧自給率が低く、農畜産物の大半が輸入に依存している以上、国際的に幅広く対応できるカンピロバクターの迅速検出・同定手段が必要となることは明らかである。本研究では、非 *jejuni/coli* 種を含めた生態分布等を解明するため米国農務省東部研究所と連携して国際的なカンピロバクターの試料・情報収集を試み、本菌の特異遺伝子解析によるデータベースを作成する。最終的に生産環境中や食品からのカンピロバクター迅速検出・種同定システムを提供する。

イ　研究方法

(ｱ) 供試菌株の収集および核酸抽出

米国農務省東部農業研究センターの Pina M. Fratamico 博士との連携により、人畜共通感染性のカンピロバクター菌株の収集を行った。最終的に USDA-ERRC と USDA-NADC 保存株の *Campylobacter* 属菌12種とその近縁種である *Arcobacter* 属菌 4 種、その他 2 株を本研究に用いた。これらの菌株を各々の培養条件下で培養し、塩化セシウム遠心法にて各々の核酸を抽出、精製した。

(ｲ) 収集菌株の特異的遺伝子配列の決定

収集した菌株について、主に系統樹解析に使用されている DNA トポイソメラーゼ β サブユニット遺伝子（*gyrB*）領域の塩基配列を決定することにした。これまでの *gyrB* 遺伝子塩基配列データベースから、供試菌株が共通して増幅できるアンカー付き共通プライマー（T7-Fwd, SP6-Rev）を設計した。本プライマーによる増幅産物およそ1500-bp を電気泳動後の切り出しにより精製し、アンカープライマーとプライマーウォーキング法により塩基配列を決定した。

(ｳ) 多重配列解析および系統樹解析

各菌種の塩基配列について *gyrB* 遺伝子の可変領域の一部1020-base について、国立遺伝学研究所 DDBJ が提供している ClustalW により多重配列解析を行い多重配列表および進化系統樹を作製した。得られた多重配列表から相同性比較表を種各々について作成した。

(ｴ) 遺伝子手法による簡易迅速同定技術の開発

得られた多重配列表を元に、*Campylobacter* 属菌12種について PCR 増幅用共通プライマーセットを作製し、共通領域900-bp を増幅できる反応系を作製した。この共通増幅領域を特定の制限酵素で処理し、そのフラグメントパターンを解析することで、PCR-RFLP による種同定法への応用を検討した。

ウ　研究結果

(ｱ) 供試菌株の収集および核酸抽出

供試菌株を収集したところ、USDA-ERRC と USDA-NADC の協力により保存株の *Campylobacter* 属菌12種とその近縁種である *Arcobacter* 属菌 4 種、その他 2 株を本研究に用いることにした。塩化セシウム遠心法にて各々の核酸を抽出したところ、極めて純度の高い精製 DNA を得た。

(ｲ) 収集菌株の特異的遺伝子配列の決定

本研究で設計された共通プライマーは、(ｱ) で収集した *Campylobacter* 属菌12種を全て増幅させることが可能であった。アンカープライマーのシークエンス反応により、菌12種全てについて増幅産物の塩基配列決定を行った。

(ｳ) 多重配列解析および系統樹解析

(ｱ) で決定した *Campylobacter* 属 *gyrB* 遺伝子の塩基配列から多重整列表を作成し、その相同性を求めたところ、種間相同性はおよそ80－60％程度であり、本遺伝子の可変領域から、遺伝子手法による簡易同定手段を作製できる可能性を示唆した。また、本遺伝子によって進化系統樹を作製したところ、従来の

16S-rRNA遺伝子によって作製された進化系統樹とほぼ類似した形であった。しかしながら、種間を比較する場合には本遺伝子は16S-rRNA遺伝子よりも変異が多いことから解像度が高く得られると考えられた。

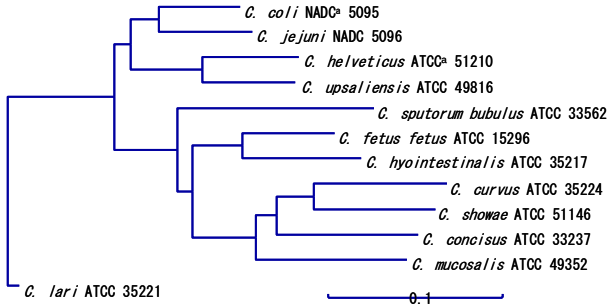


図3103-1　決定された遺伝子配列から作製された進化系統樹

(ｴ) 遺伝子手法による簡易迅速同定技術の開発

(ｳ)の相同性比較結果を基に、PCR-RFLP によるキャンピロバクター種の簡易迅速同定技術の開発を試みた。多重整列表から作成した共通領域を増幅する共通プライマーセットを作製し PCR に供したところ、いずれの菌種においても900-bp の増幅産物を得ることが可能であった。また、得られた増幅産物を特定の制限酵素にて消化させ電気泳動に供すると、各々の種によってフラグメントパターンが異なることを発見した。

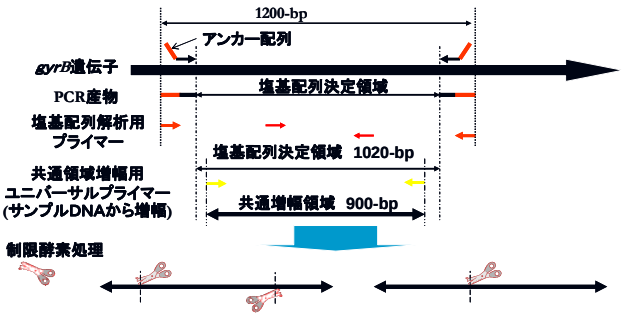


図3103-2　本研究に用いたプライマー領域および制限酵素による特定技術の概略図

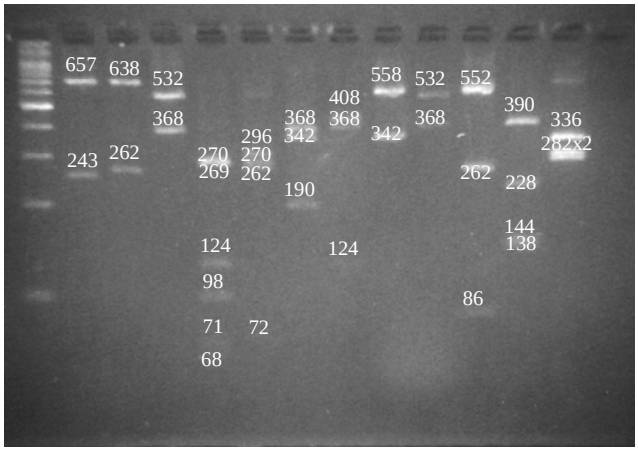


図3103-3　共通領域を制限酵素処理した際の電気泳動パターン

エ　考　察

キャンピロバクター属は世界中での胃腸炎の原因として最も頻発しており、キャンピロバクターによる感染はギランバレー症候群（Guillain Barre's syndrome）を含んだ深刻な後遺症を引き起こす。主として *C. jejuni* によるキャンピロバクター汚染が毎年おおよそ200万件米国にて発生しており、日本においても急激に食中毒患者数が増加しているところである。しかしながらキャンピロバクターにおいて *C. jejuni* 以外の種における分類や感染の発生頻度においての正確な情報は把握できておらず、キャンピロバクター汚染の発生件数と 1 年に必要な関連費用については、近年の概算よりもさらに高いと推定される。例えば *C. lari* や *C. upsaliensis* はヒト下痢症の原因菌であるし、近年では *C. curvus* は出血性胃腸炎の散発事例と関連していた。食品中や動物、環境中においてキャンピロバクターの感染経路や流行を解明するために、キャンピロバクター種それぞれについての特異的かつ正確な検出法が必要とされていた。しかしながら、本菌は微好気条件でなければ培養できず、その検出および同定には熟練の技術を必要とするために、疫学的調査が困難であった。これまで、キャンピロバクター属内の種の分類化のために多くの遺伝子手法が述べられてきたが、種々の株で見出された変異のレベルは満足できるものではなく、いずれの手法も信頼して実用に用いることが出来るものではなかった。rRNA 遺伝子のような標的遺伝子では、種間において十分な塩基置換頻度を持たないゆえ、種特異的プライマーやプローブを設計できない。キャンピロバクターの種同定に用いることができる

商業的利用可能なキットは一般的に存在しておらず、キャンピロバクターの *gyrB* 遺伝子を標的にした手法については未だかつて報告されていない。キャンピロバクターの *gyrB* 遺伝子の塩基配列情報を活用した制限酵素切断フラグメント（RFLP）解析は、キャンピロバクターの検出や種間の違いを明確化するための手法として具体的なものである。このような手法は臨床や獣医診断などに有用性を持つであろう。

オ　今後の課題

さらなる簡易な同定法や特異的検出への応用を検討するため、各種において特異的プライマーを設計し、PCR 法による直接検出の開発を次期プロジェクトで試みる。今後、疫学調査を行うためには連携機関などを通じて、さらなる菌株コレクションの取得およびデータ収集を行う必要がある。

カ　要　約

米国農務省東部農業研究センターとの連携により、人畜共通感染性のカンピロバクター菌株の収集を行い、収集した菌株の DNA トポイソメラーゼ β サブユニット遺伝子（*gyrB*）領域を設計した共通プライマーで PCR 増幅し、塩基配列決定し進化系統樹解析を行った。また遺伝子解析手法にて、簡易に種同定を行える手法を開発した。PCR 増幅用共通プライマーセットを作成し、共通領域を増幅できる反応系を確立した。共通領域の配列について解析したところ、特定の制限酵素による消化を行えば、菌種毎にフラグメントパターンが異なることを発見した。本共通プライマーセットと制限酵素処理による遺伝子解析手法にて、簡易に種同定を行える可能性が示唆された。

キ　引用文献

Altekruse, S. F., J. M. Hunt, L. K. Tollefson, and J. M. Madden. 1994. Food and animal sources of human *Campylobacter jejuni* infection. *J. Am. Vet. Assoc.* 204:57-61.

Harrington, C. S., L. Moran, A. M. Ridley, D. G. Newell, and R. H. Madden. 2003. Inter-laboratory evaluation of three flagellin PCR/RFLP methods for typing *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: the CAMPYNET experience. *J. Appl. Microbiol.* 95:1321-1333.

Gorkiewicz, G., G. Feierl, C. Schober, F. Dieber, J. KÉfer, R. Zechner, and E. L. Zechner. 2003. Species-specific identification of campylobacters by partial 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 41:2537-2546.

Kawasaki, S., Fratamico, P. M., and Kawamoto, S. 2005. Species-specific identification of Campylobacters using PCR-RFLP and PCR targeting the gyrase B gene. 34th UJNR Food & Agriculture Panel Meeting, Susono. 291-295.

Yamamoto, S. and S. Harayama. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1104-1109.

研究担当者（川崎晋*、川本伸一）

4　腸管上皮細胞を用いた有害物質の腸管透過性評価技術の開発とその応用

ア　研究目的

食品中への混入が危惧されている重金属類や環境汚染化学物質の腸管における吸収性やその機構、腸管機能に及ぼす影響などを明らかにすることは食品の安全性向上を考える上で重要である。本研究では重金属類や環境汚染化学物質として、カドミウム、トリブチルスズ（TBT）、ダイオキシン類（TCDD）を取り上げ、その腸管吸収評価技術を確立するとともに、これらが腸管上皮細胞の機能に及ぼす影響について検討した。カドミウムとダイオキシンについては、開発した吸収評価系を用いてその腸管吸収を抑制する機能を持つ食品素材の探索を進めた。また、カドミウムを対象にヒト腸管培養細胞系およびマウス実験系を立ち上げ、カドミウムの腸管吸収性や毒性の検証を *in vitro*, *in vivo* 両面から明らかにすることにした。さらに、TBT が腸管上皮機能に及ぼす影響についても検討した。このように、腸管での吸収性と腸管細胞・組織に及ぼす毒性を指標に有害化学物質の評価技術を開発するとともに、これらの物質の腸管吸収を制御する食品因子を探索し、有害成分のリスクを低減化する機能を持つ食品開発の基盤を構築する。

イ　研究方法

(ア) 腸管上皮細胞の培養

ヒト腸管由来上皮細胞株 Caco-2 を透過性膜（Trans-well）上に撒き、14日間単層培養して十分に

分化させたものを実験に使用した。

(ｲ) 腸管上皮細胞層の透過試験

カドミウムおよびTBTの透過性試験には放射活性カドミウムおよびTBTのトリチウム標識体を用いた。これらを検査試料とともにCaco-2細胞層の粘膜側に加え、一定時間後に基底膜側の放射活性を測定して透過性を算出した。ダイオキシンに関しては、まずこれに応答してルシフェラーゼ遺伝子を安定発現する検出用細胞を肝細胞を用いて作成し、この検出用細胞とCaco-2細胞層を組み合わせた腸管吸収評価系を構築した。

Caco-2細胞層の粘膜側に^{109}Cd、^{3}H標識TBT、あるいはTCDDを加え、検体試料存在下で一定時間インキュベートした後に、基底膜側の溶液を回収した。カドミウムやTBTでは基底膜側溶液の放射活性を測定することにより、TCDDではこれを検出用細胞に加えた時に発現するルシフェラーゼの活性を測定することにより、有害化学物質の透過量を測定した（図3104-1）。本実験系により有害化学物質の腸管吸収に対する各種食品素材の抑制効果を調べた。

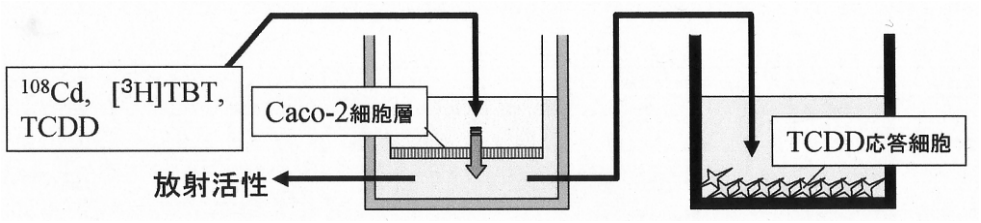


図3104-1　本研究で用いたin vitro透過実験系

(ｳ) カドミウムに対する腸管上皮細胞の応答の*in vitro*解析

カドミウムをCaco-2細胞に加えて培養し、細胞内の遺伝子発現変化をDNAマイクロアレイを用いて観察した。またサイトカイン、特にIL-8の産生変化をELISA法で測定した。遺伝子レベルでの発現は、ノーザン分析やReal-time PCR法により解析した。

(ｴ) カドミウムに対するマウス腸管の応答の*in vivo*解析

カドミウムをICRマウスに胃内投与し、ケモカインであるMIP-2や炎症関連酵素であるmyeloperoxidaseの遺伝子発現変化を指標に、腸管における炎症の発生を観察した。また、体重変化、腸管長、腸管の病理学的・組織学的観察を行って炎症の程度を評価した。

ウ　研究結果

(ｱ) カドミウムおよびTBTの腸管吸収機構と吸収阻害性食品因子の検索

Caco-2細胞層を用いた実験により、カドミウムはプロトン依存的なトランスポーターを介して細胞内に取り込まれること、またTBTは拡散による受動輸送で細胞層を透過していることが確認され、構築した実験系が本研究の目的に有効であることが示された。

次いで、これらの実験系に食物繊維やペプチドなどの試料を添加して一定時間培養し、カドミウムやTBTの輸送に及ぼす食品成分の阻害効果を調べた。その結果、卵黄タンパク質分解ペプチド（YP）とカゼインカルシウムペプチド（CCP）に顕著なカドミウム取り込み阻害効果が観察された。ゲルろ過クロマトグラフィーを用いてYPとカドミウムとの結合性を調べた結果、YPへのカドミウムの吸着が確認されことから、ペプチドへの吸着がカドミウム吸収抑制の主要な機構と考えられた。一方、TBTの透過は、ペプチド類による影響はあまり受けず、むしろカゼインや乳清タンパク質およびその分解によって生成する高分子量のペプチドによってその透過性が抑制された。

(ｲ) ダイオキシン類の腸管吸収機構と吸収阻害性食品因子の検索

Caco-2細胞層を透過したTCDDを、TCDD応答性のレポーター遺伝子を導入したHepG2細胞株を用いて測定することにより、腸管透過評価系を作製することができた（Natsumeら，2003, 2005）。この実験系を用いてTCDDの透過を抑制する食品因子を探索した結果、不溶性食物繊維、クロロフィル、茶殻等に抑制効果を見出した。特にクロロフィルには強い抑制作用が見出され（図3104-2）、すでに報告されている*in vivo*実験のデータ（Moritaら，2001）を裏付ける結果が得られた。また、茶殻を急速凍結処理して

表面多孔化を行ったところ、その TCDD 吸収抑制効果が著しく上昇することを見出した（図3104-3）（Natsume ら，2005）。

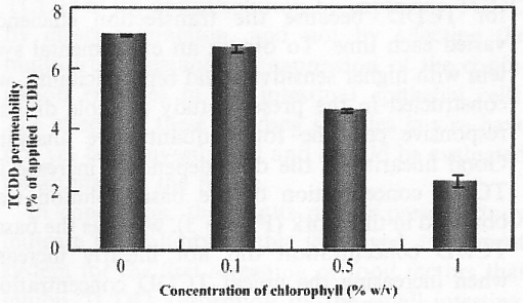


図3104-2　クロロフィルによる TCDD 吸収の抑制

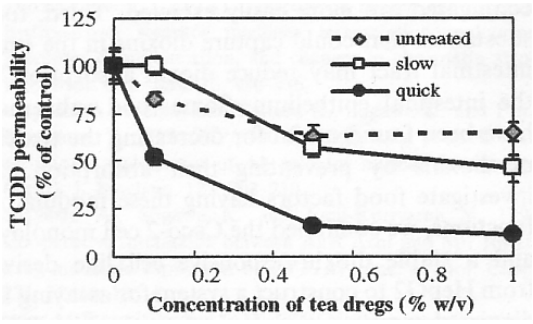


図3104-3　急速凍結処理による茶殻の TCDD 吸収抑制活性の上昇

(ウ) カドミウムおよび TBT が腸管上皮細胞に及ぼす影響の検討

Caco-2細胞にカドミウムを作用させると、細胞の IL-8分泌が亢進することが見出された（図3104-4）。そこで、カドミウムによる IL-8分泌亢進機構を解析するため、まず real-time PCR 法を用いて IL-8 mRNA 発現量を測定した。その結果、カドミウム処理によって IL-8 mRNA 発現レベルが有意に増加していることが確認された。さらに ELISA 法を用いた分析の結果、カドミウムは時間依存的・濃度依存的に IL-8 タンパク質の分泌を誘導することが示された。一方、カドミウム刺激による TNF-α，IFN-γ，IL-1β の分泌変化は認められなかった。カドミウムに対して応答する因子を検索するため、レポーターアッセイを用いてヒト IL-8 promoter 上流500bp 領域の主な転写因子結合配列の関与を調べた結果、NF-κB consensus element の存在が IL-8応答に重要であることが示唆された。NF-κB 阻害剤処理による IL-8分泌の減少、NF-κB 応答配列 mutant vector を導入した Caco-2細胞及び NF-κB ノックダウン細胞での IL-8転写活性の減少、カドミウムによる I-κB の分解促進などの実験結果から、カドミウムによる IL-8分泌亢進は転写レベルでの調節であり、その機構は I-κB 分解を介する NF-κB 活性化によるものであると考えられた（Hyun ら、投稿中）。

TBT 処理によっては、まず Caco-2細胞層のタイトジャンクションの破壊が起こるが、それと平行して異物排出トランスポーターMDR1（P-糖タンパク質）の発現が誘導され、細胞内への MDR1基質の蓄積が減少することが見出された。また、この変化は MDR1 遺伝子の転写レベルでの活性化によるものであることが明らかになった（Tsukazaki ら，2004）。

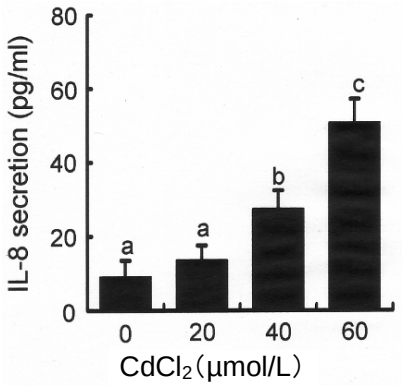


図3104-4　Cd による Caco-2の IL-8分泌亢進

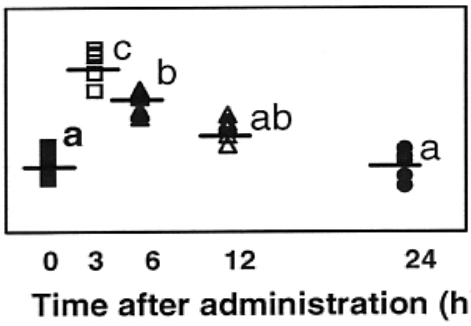


図3104-5　Cd 投与したマウス腸管の MIP-2分泌

(エ) カドミウム摂取によるマウスの腸管炎症惹起

カドミウムが Caco-2細胞における炎症性サイトカイン IL-8の分泌を亢進したことを受け、*in vivo* でのカドミウムの効果をマウスを用いて検討した。まず6週齢 ICR マウスに $CdCl_2$ 25-100 mg/kg（体重）を胃内投与し、0，3，6，12，24時間経過後に十二指腸と小腸を摘出して炎症性サイトカインの発現分析を行った。その結果、カドミウム投与3時間経過後から、IL-8のマウス homologue である MIP-2の急激な発現変

化が観察された（図3104-5）。一方、他の炎症性サイトカインである TNF-αや IL-1βの発現へのカドミウムの影響は見られなかった。また、3時間後のMIP-2発現変動に対するカドミウム濃度依存性を調べた結果、25mg/kg 以上のカドミウム投与によって、正常群に比べ MIP-2の有意な発現増加が観察された。以上の結果から、腸管での炎症性サイトカイン IL-8のカドミウムによる発現誘導は、培養細胞系のみならず実際の腸管組織においても起こることが明らかになった。また、MIP-2の発現上昇とともに、炎症反応関連酵素である Myeloperoxidase の活性も上昇する傾向が認められ、カドミウムの腸管炎症惹起効果が示された（Zhao ら、2006）。

エ　考　察

(ア) 有害化学物質の腸管吸収評価系について

Caco-2細胞層を用いることにより、TBT のような脂溶性物質の受動拡散輸送、及びカドミウムのような重金属のトランスポーターを介した能動輸送のいずれをも観察することができた。特に放射活性物質を利用できれば感度良くそれらの輸送解析をおこなうことが可能であり、本実験系は有害化学物質の吸収阻害因子の一次探索系として有用であると考えられた。一方、本研究ではダイオキシン類に感度良く応答する細胞を作出し、これを用いたレポーターアッセイ系を用いることにより、その腸管吸収挙動の評価系を初めて構築することに成功した。これにより、極微量のダイオキシンを用いてその吸収制御作用を持つ食品素材、食品成分を探索することが可能になった。特に、加工処理することによって食品素材にダイオキシン吸収制御機能を付与する、あるいは向上させる場合に、本実験系はその条件検討を容易にすると考えられる。本研究では、凍結処理をすることによって茶殻のような未利用素材にダイオキシン吸収制御機能を付与・増強することが可能なことを見出したが、これには本実験系が不可欠であった。このように、きわめて微量な有害物質が測定可能な実験系を構築することの意義は大きいと考えられる。

(イ) 有害化学物質の作用に対する腸管上皮細胞の応答について

本研究の結果、腸管上皮細胞は有害化学物質に対して多様な応答を示すことが明らかになった。カドミウムによる炎症性サイトカインの発現上昇や、TBTによる異物排出トランスポーターMDR1の発現上昇はその好例である。このような現象を見出すことは、有害化学物質の体内での毒性を理解する上で重要であるとともに、有害物質を検出、評価するための新しい手法開拓につながるものである。例えば、TBTによる MDR1の発現上昇には PXR のような核内受容体の活性化が関与しており、これを利用して新規な毒性検出・評価法の構築が期待できる。我々はそのような視点での検討をすでに開始している。

オ　今後の課題

(ア) 有害化学物質の腸管吸収評価系について

動物個体を用いた有害物質吸収評価は様々な面から制約が多く、細胞培養系を用いた評価系の意義は大きい。しかし、腸管細胞層のみの評価は、生体における吸収の1過程を見ているに過ぎず限界がある。両者のギャップを埋めるような評価系の構築が課題である。また、細胞実験系は細胞の培養条件、使用試薬（血清等）のロット、実験者などによって実験値が大きく変動しがちである。より再現性の良い実験系の構築も検討する必要がある。

(イ) 有害化学物質の作用に対する腸管上皮細胞の応答について

カドミウムにより Caco-2細胞の IL-8産生が誘導されるという *in vitro* 実験の結果が、マウスを用いた実験でも再現されたことから、*in vitro* 実験系の有用性が示された。我々は最近、ダイオキシン類により腸管上皮細胞の解毒酵素発現が上昇するという *in vitro* 実験の結果を、*in vivo* 系（マウス）を用いて検討中であるが、このような *in vitro*, *in vivo* 両実験系の相関性を、さらに多くの事例で確認していくことも重要な課題である。

カ　要　約

(ア) 有害化学物質の腸管吸収評価系について

ヒト腸管上皮細胞の単層培養系を用いて、カドミウム、トリブチルスズ、ダイオキシンの腸管吸収性評価法を構築した。また、本評価法を用いて、上記有害化学物質の吸収を抑制する食品因子の探索を試みた。

(イ) 有害化学物質の作用に対する腸管上皮細胞の応答について

腸管上皮細胞が有害化学物質の刺激に対して様々な応答を示すことを見出した。特に、カドミウムによって IL-8のようなサイトカイン産生が誘導される

ことを *in vitro*、*in vivo* 両実験系を用いて明らかにし、その機構を解析した。

キ　引用文献

Morita K. et al. 2001. Chlorophyll derived from Chlorella inhibits dioxin absorption from the gastrointestinal tract and accelerates dioxin excretion in rats. *Environ. Health Perspect.* 109：289-294.

Natsume Y. et al. 2003. Evaluation of intestinal dioxin permeability by using human intestinal Caco-2 cell monolayers. Food Sci. Technol. Res. 9：364-366.

Natsume Y. et al. 2005. Establishment of an assessment system for dioxin absorption in the small intestine and prevention of its absorption by food factors. *Cytotechnology.* 47：79-88.

Tsukazaki M. et al. 2004. Effects of tributyltin on barrier functions in human intestinal Caco-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315：991-997.

Zhao Z. et al. 2006. Oral exposure to cadmium chloride triggers and acute inflammatory response in the intestines of mice, initiated by over-expression of tissue macrophage inflammatory protein-2mRNA. *Toxic. Lett.* 164：144-154.

研究担当者（清水　誠*、薩　秀夫、Hyun Ja Shil、Zhao Zhaohui）

5　作物における重金属元素等の動態解析と制御

ア　研究目的

これからの高齢化社会に備え、いかに重金属汚染を防ぎ「食の安全」を図ることができるかは最重要課題のひとつである。また重金属を含む化学物質の使用量が年々増加するため、汚染土壌に対して、Codex 委員会による基準値が検討された結果、特にカドミウムは精米で0.4ppm、小麦は0.2ppm、野菜類は0.05～0.2ppm へと規制が強化されようとしており、そのための緊急対策を講じることが急務な事態となってきている。我国では Ni-Cd 電池の生産量が非常に多いことも関連し、カドミウム濃度が1.0ppm 前後という高汚染土壌も存在しているため、育成した穀物中にどの程度カドミウム汚染が生じるかをシステマティックに調べる必要がある。現在ダイズについては、主要なカドミウム摂取源ではないので基準値は設定しないという方向に至っているものの、本研究ではこれらの状況を踏まえ、まず土壌および植物中の微量重金属分析法の見直しを行った。次にダイズなどの作物重金属吸収動態について、特に可食部への移行が品種の差によりどのように制御されているかを、種子の生育期間を通して検討した。そして重金属トレーサーを用い、植物体内での重金属の蓄積動態のみならず、いかに汚染土壌からの重金属汚染を軽減できるかという応用へと展開する。

イ　研究方法

(ｱ) 異なるダイズの品種を対象に Cd 蓄積濃度について調べた。用いた品種は、En-b0-1-2、アキシロメ、アキヨシ、あやこがね、いちひめ、いわいくろ、エルスター、エンレイ、おおすず、大袖の舞、オオツル、ギンレイ、サチユタカ、鈴の音、スズユタカ、タチナガハ、タマホマレ、つるのこ、ツルムスメ、東北126号、トモユタカ、ナスシロメ、納豆小粒、ナンブシロメ、ニシムスメ、ネマシラズ、ハタユタカ、ハヤヒカリ、ヒメシラズ、ヒュウガ、フクユタカ、ホウレイ、ライデン、リュウホウの34品種である。これらの種子を洗浄後、バーミキュライトで 2 日間、26℃で暗所において発根させた。次にこれらの34品種の幼植物を 3 μmol/L Cd を添加した完全水耕液でバイオトロン中 7 日間生育させた後、続けて 2 日間10 μmol/L Cd を添加した完全水耕液で生育させ、植物地上部と根に分けて各々の Cd 蓄積量を測定した。また主根慎重ならびに乾燥重量変化についても測定を行った。

(ｲ) 放射化分析法では植物各組織を高純度ビニル袋に 2 重に封入し、日本原子力研究所東海研究所の研究用原子炉（JRR-3M）において短時間（数秒）および長期照射（数時間）照射を行った。照射後、γ線スペクトロメトリにより元素の定量を行った。また同じ試料を用い、ICP-AES などによる元素分析を行い各手法における検出感度の差を検討した。

(ｳ) ポット試験 1（土耕栽培）では、水耕栽培により選抜した 5 品種、納豆小粒、サチユタカ、タチナガハ、スズユタカ、おおすずについて土壌栽培によりどのくらい Cd 濃度が高くなるかについて、汚染土壌を用いた実験を行った。土壌は通常の Cd 濃度（0.02ppm）を含む土壌ならびに汚染土壌（0.14ppm）を調製し、 5 品種を播種した。種子形成後、植物を採取し、葉、茎、さや、種子を分け取り放射化分析用試料とした。

(エ) ポット試験２（土耕栽培）として、ダイズをさらにスズユタカとサチユタカの2品種に絞り、Cd濃度を段階的に調整した汚染土壌を用いて生育試験を行った。高濃度 Cd 汚染土壌を0%、25%、50%および75%、黒ボク土壌に添加し、Cd 濃度を0.1、0.4、1.2および2.0ppm とした（0.1 mol/L 塩酸抽出法）。また、可食部を中心とした Cd の吸収蓄積動態を調べるため、種子成熟度の異なる３ステージの植物体を採取し、根・茎・葉・莢・種子に切り分けて乾燥させ、土壌試料と合わせて ICP-AES ならびに放射化分析を行った。同時に植物の生育に伴う土壌中の元素濃度の変化についても調べた。

(オ) 他元素による Cd 障害緩和作用分析法の検討を行うため、元素分析結果から Cd と Mg の植物体中の相関解析を行い Cd の生育障害に対する Mg の緩和効果を検討した。Cd 添加溶液中（2 m mol/L $CaCl_2$ + 15 μmol/L Cd + $MgSO_4$）でダイズを育成させ主根の伸長回復を調べた。

(カ) Cd 吸収動態を解析するため Cd の放射性トレーサー^{109}Cd を用い、pH4.5および pH6.5の水耕液からダイズに吸収される Cd の蓄積分布を調べた。また、Cd 処理を行った植物の水吸収を調べるため、放射線医学総合研究所で調製したポジトロン放出核種である^{15}Oで標識した水を用い、イメージングプレートを用いることにより、地上部への水動態を調べた。

ウ　研究結果

(ア) 図3105-1に34品種についての Cd 蓄積濃度、根の伸長ならびに根の乾燥重量についての結果を示した。その結果選抜した15品種についてのデータを図3105-2に示した。これらの結果から植物全体に Cd 蓄積量が多い品種として、納豆小粒、サチユタカが、少ない品種としてタチナガハが選抜された。また、地上部への Cd 移行性が高い品種としてスズユタカが、低い品種としておおすずを選抜した。

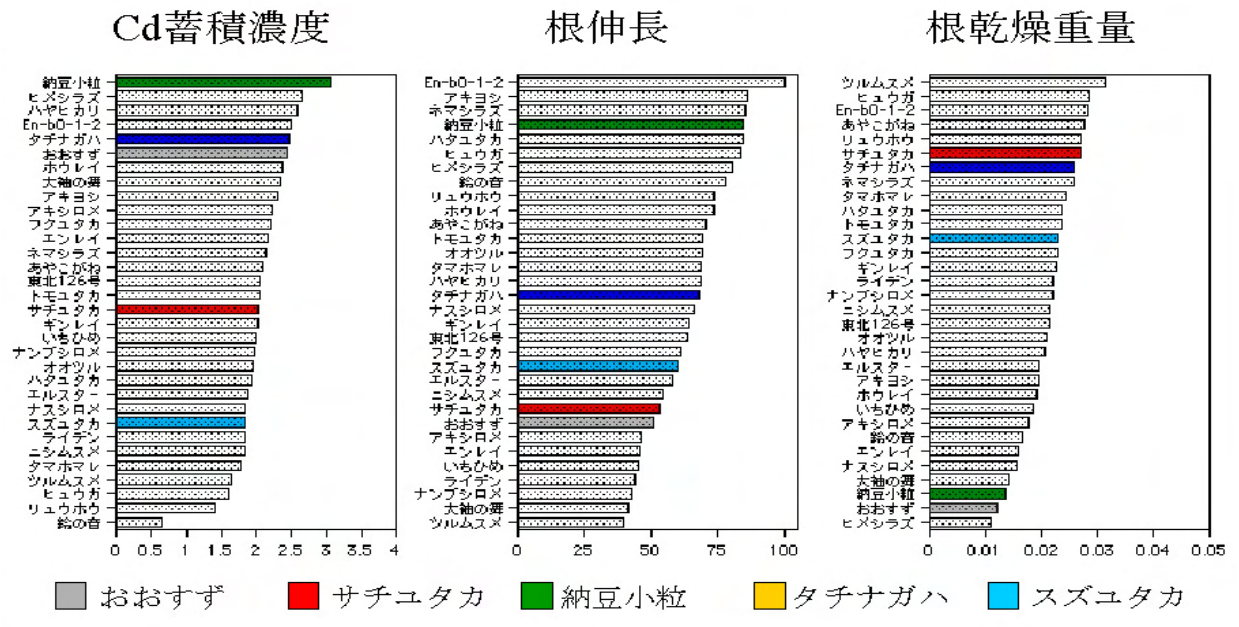


図3105-1　ダイズ34品種の比較（3 μmol/L Cd 添加）

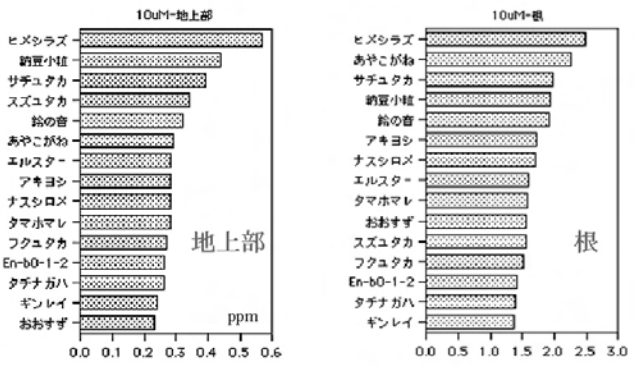


図3105-2　選抜したダイズ15品種の比較
（10 μmol/L Cd 添加）

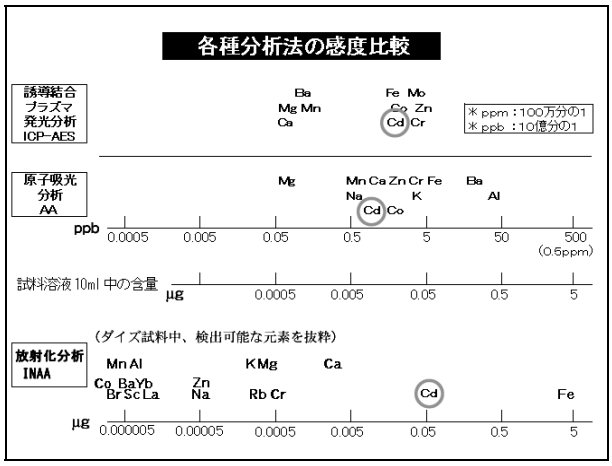


図3105-3　各分析法による元素の検出感度の比較

（ｲ）植物中元素濃度について放射化分析ができる元素の感度と定量性を照射時間や植物調製法を検討することにより求めた。ICP-AES では検出できない Na と K の定量性の確認、検出される重金属の感度についても検討を行った（図3105-3）。ICP-AES では試料要液（10ml）中の元素含量をプロットした。図 3 は試料中定量可能だった元素のみを抜粋して並べたものである。放射化分析における主な検出元素は、Na, Mg, Al, K, Ca, Sc, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Sc, La, Br, Ba, Rb などであった。

（ｳ）15品種を用いたポット試験結果を図3105-4に示した。Cd の植物中への蓄積は茎＞葉＞種子＞さやの順で高く、品種間差異も大きかった。今回用いた土壌（抽出液0.14 ppm Cd）では可食部への Cd 蓄積は0.2 ppm を超える品種があった。Cd の他元素蓄積への影響は元素毎に異なる濃度を示したが、種子中濃度は Cd, Zn を除く殆どの元素で一定値であった。

（ｴ）ポッと試験 2 で調整した汚染土壌の Cd ならびに他の元素濃度を図3105-5に示した。土壌 A から D において Cd のみならず他の 6 種類の元素全ての濃度が単調増加する傾向がみられた。この 4 段階に Cd 濃度を設定した土壌を用い、植物体中の Cd の蓄積量を調べたところ、品種別にはスズユタカの Cd 蓄積が最も高く、サチユタカの Cd 蓄積は低かった（図3105-6）。

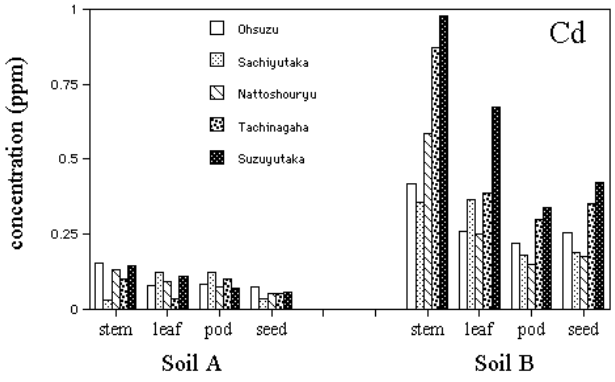


図3105-4　5 品種についての地上部各組織ごとの Cd 蓄積濃度（ポット試験１）
SoilA（非汚染土壌）および SoilB は抽出液中の Cd 濃度が各々、0.02 ppm、0.14 ppm である。

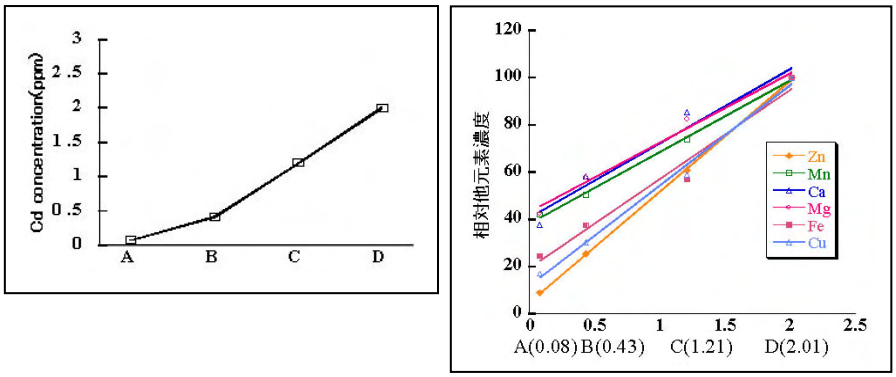


図3105-5　ポット試験２で調整した汚染土壌
左図：各土壌中の Cd 濃度
右図：各土壌中の他の元素濃度

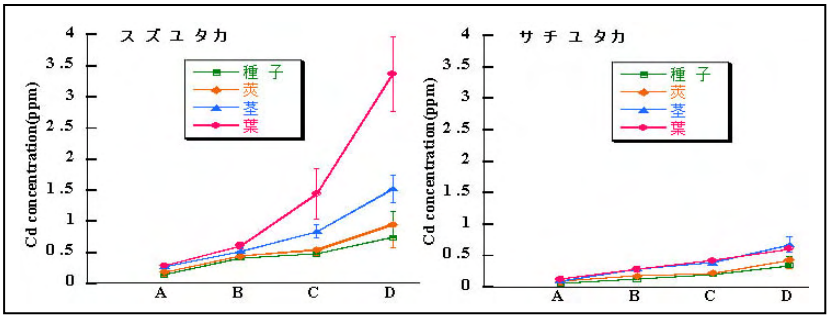


図3105-6　スズユタカとサチユタカについての地上部各組織ごとの Cd 蓄積濃度（ポット試験２）SoilA（非汚染土壌）から SoilD 中の Cd および他元素濃度は図５に示されている。

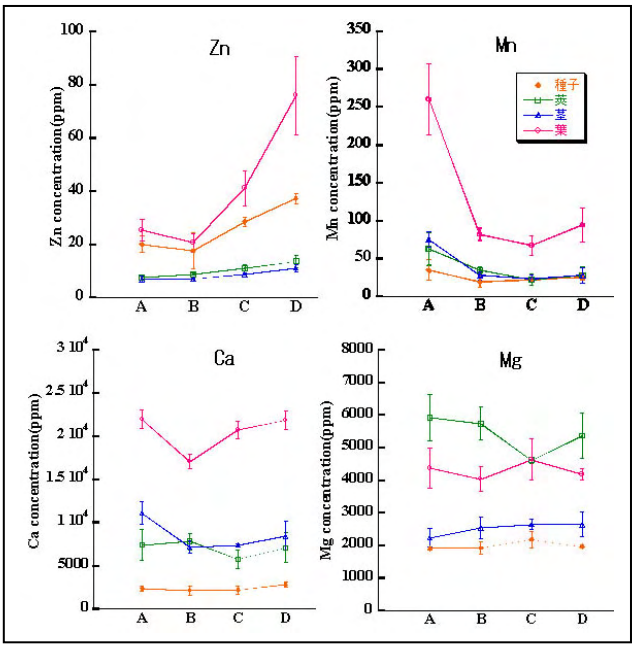


図3105-7　スズユタカ各組織中の元素濃度

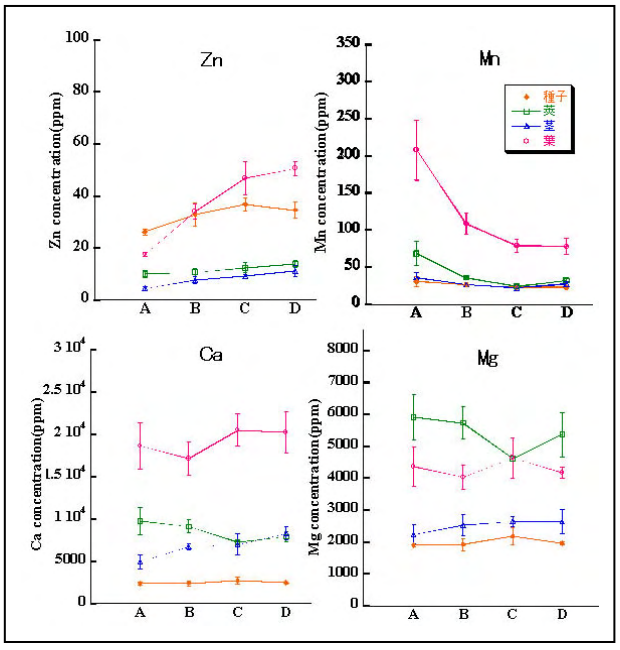


図3105-8　サチタカ各組織中の元素濃度

(エ) Mg による Cd 障害緩和実験を行った結果を図3105-9に示した。また多元素同時測定が可能な放射化分析法により、Cd 処理による他の元素濃度への影響は、Na、Mg、Al、K、Ca、Mn、Sc、Cr、Co、Zn、Br、Rb、Ba、La および Yb にみられた。

(オ) Cd トレーサー^{109}Cd を取り込ませた試料の薄切片を作製し、遮蔽環境下で IP に１ヶ月間コンタクトした後、高性能 BAS で読みとることにより組織レベル(数100 μm)での Cd 分布の可視化が可能となった。また、pH4.5から6.5に上昇すると地上部への Cd 移行量が減少するが^{15}O を用いた実験により水の地上部への移行が減少する傾向がみられた。

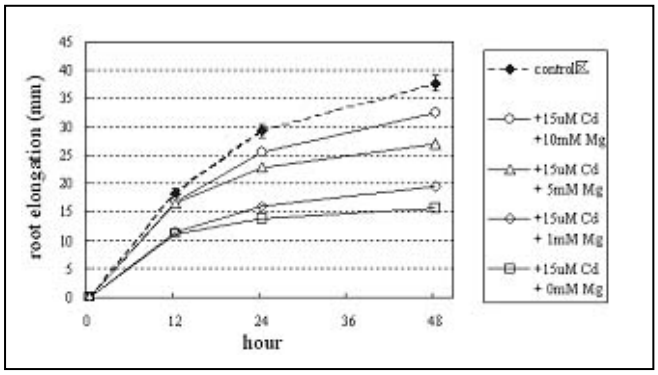


図3105-9　水耕液中の Mg 濃度増加による Cd 障害からの主根伸長緩和作用
コントロールは2 mmol/L Ca 単純水耕液であり、これに15 μmol/L Cd（約1.5 ppm）を添加し、さらに Mg を10 mmol/L まで徐々に増加させた。

エ　考　察

(ア) 放射化分析法により多元素が約50 mg の試料で非破壊分析が可能なことが示された。ダイズ試料における放射化分析可能な核種のプロファイルが得られた。

(イ) 34品種から 2 回の水耕による選抜ならびに 2 回の土壌試験の結果、サチユタカの可食部への Cd 蓄積量が低いことが判った。サチユタカは全ての組織でスズユタカよりはるかに低い濃度の Cd が蓄積された。種子中の Cd 濃度はスズユタカは Cd0.1 ppm 土壌で生育させたもののみ0.2 ppm を下回ったが（約 0.17 ppm)、サチユタカは Cd0.4 ppm 土壌で生育させたものでも0.2 ppm を下回っていた（約0.18 ppm)。サチユタカは葉における高い Cd 蓄積傾向にも関わらず、種子中 Cd 濃度は葉の Cd 濃度の約1/2～1/5であった。このことは葉から種子への Cd の転流が制御されているか、Cd が導管経由で（葉を経由せずに）種子に到達していることが考えられた。

(ウ) ポット試験の結果、植物中の Cd 濃度と Mn 濃度の負の相関は単調減少ではなく、下に凸の曲線を描くことが今回の混合土壌系により明らかとなった（図3105-10)。特に B 区の Cd 濃度（0.43 ppm）ではすでに葉における Mn 濃度が半減しており、B 区以下の Cd 濃度においては Mn 濃度に大きな変化が無かった。このことから葉における Mn 濃度を指標にすることで、土壌の Cd 汚染度を予測出来るのではないかと考えられた。

(エ) コントロール土壌ならびに Cd 汚染土壌で育成させた植物各組織の Mg と Cd の濃度比は茎のみ差が出たものの、他の組織ではほぼ同じ値となった。そこで Mg による Cd 障害の緩和作用を調べたところ10 m mol/L の Mg 添加により Cd 障害がかなり回復されることがわかった。特に葉での Mg 減少に着目したところ、Mg による Cd 障害緩和効果が認められた。

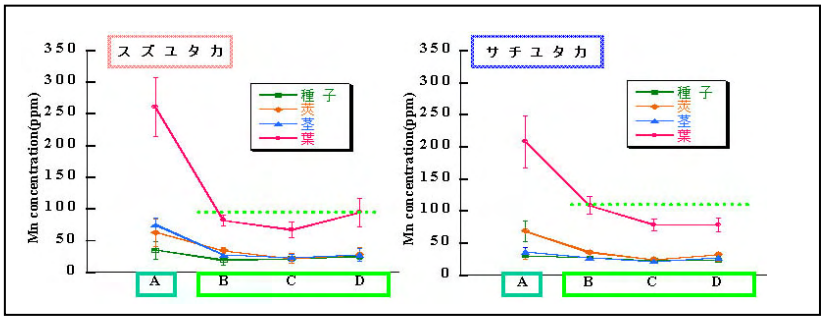


図3105-10　スズユタカとサチユタカ中の各組織における Mn 濃度

(オ) ^{109}Cd トレーサーを用いた結果、植物の根では pH 条件に関係なく Cd は根の組織内に浸透すること また、根から地上部へ転流される Cd の量はｐH4.5 ＞pH6.5（3 倍程度）であること、地上部の Cd の転流は水耕液のｐH にあまり依存しないことなどが示され、Cd は主に維管束を経由して転流されると考えられた。

オ　今後の課題

今回得られた結果を基に多元素同時分析法を進め、植物のイオノーム分析から植物への微量元素の蓄積動態とゲノムとの関係を調べていきたい。

カ　要　約

(ア) 34品種のダイズの Cd 蓄積様式を 2 回の水耕による選抜ならびに 2 回の土壌試験の結果から求めた。用いた土壌は汚染させた土壌ではなく Cd 濃度が高

いことが判明した土壌を用いて試験を行った。サチユタカの可食部におけるCd蓄積量は低く、かつ土壌中のCd濃度が上昇しても種子のCd濃度は0.2ppm以下に抑えられることが示された。

(ｲ) 水耕でMgを10 m mol/L添加した場合約60～70%のCd障害緩和効果が認められた。

(ｳ) 放射化分析とICP-AES分析を比較し各分析法で得られる元素の種類・感度などを検討した。分析できる元素の感度と定量性を照射時間や植物調製法を検討することにより求め、ICP-AESでは検出できないNaとKの定量性の確認、検出される重金属の感度についても検討を行った。

(ｴ) 地上部へのCdの転流は水耕液のpHにあまり依存しないことが示され、Cdは主に維管束を経由して転流されることが示唆された。

キ　引用文献

1. Hayashi. Y. et al., Element analysis and radioactivity measurement within a wood disk by neutron activation. analysis. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 255(1), 115-118 (2003)
2. Nakanishi. T. M. et al., Water movement in a plant sample by neutron beam analysis as well as positron emission tracer imaging system. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 255(1), 149-153 (2003)
3. Tanoi, K. et al., Neutron beam analysis of water and elements in plant sample. Proc. of 46th Annual meeting of the J. Soc. of Plant Phys, s21 (2004)
4. Tanoi, K. et al., Real-time measurement of the element movement in a plant sample using positron emitting nuclides. *ibid*, s21 (2004)
5. Nihei, N. et al., Influence of mercury on a soybean plant (*Glycine* max. L.) at low pH. Proc. of the 6th Internal. Sym. on Plant-Soil Interactions at Low pH., pp238-239. (2004)
6. Iikura, H. et al., Cadmium effect on an elemental profile in the edible part of soybean plants revealed by INAA. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 264 (2), 307-311 (2005)
7. Ohya, T. et al., A study of ^{109}Cd uptake and translocation manner in a soybean plant under different pH conditions. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 264 (2), 303-306 (2005)
8. Nihei, N. et al., Influence of Mercury on Soybean Plants (*Glycine* max. L.) at Low pH. Soil. *Sci. Plant Nutr.*, 51(5), 725-727 (2005)

研究担当者　(中西友子*、飯倉寛、田野井慶太朗、大矢智幸、二瓶直登、羽鹿牧太)

6　魚介類中のカドミウムおよび水銀の濃度現状把握、分析手法の確立、および存在形態の解明

ア　研究目的

魚介類は食生活における水銀の主な摂取源であり、日本人の平均的な食事から摂取される水銀の87%は魚介類由来と算定されている。メチル水銀リスク管理には、高レベルの水銀を含む魚種の水銀濃度を把握し、水銀の摂取量を低減する管理が必要であるが、日本の水銀の暫定的規制値（総水銀0.4 ppm、メチル水銀（水銀として）0.3 ppm）はマグロ、カジキ類およびクジラ類等の高レベルの水銀を含む種を対象外としているため、水銀含有量データ数が不足していた。そこで、本研究は現在流通している魚介類の筋肉、肝臓など可食部における水銀含量を魚種、体重、および産地別に調べた。

日本人の平均的な食事から摂取されるカドミウムの26%は魚介類由来である。主な摂取源は米であるが、タコイカ等の軟体動物の肝臓には1 ppmを超えるカドミウムが含まれる。また、魚肉はカドミウム含量が0.01 ppm未満のものが多いが、暴露評価に際し、濃度を0と推定するか否かで推定暴露量は大きく異なる。このため、本研究ではカドミウムの分布をppbレベルで分析するシステムを整え、基礎的知見に資する基盤を構築する。

重金属の毒性はその化学形態によって変動するため、リスク分析・管理を進める上で、化学形態を知る必要がある。そこで、本研究では水銀の魚類筋肉での化学形態を解明する。特に、特異的な重金属結合タンパク質を分離同定する。このような知見はリスク分析・管理手法の高度化に貢献するものである。

イ　研究方法

(ｱ) 魚介類に含まれる総水銀、メチル水銀およびカドミウムの現状把握

試料魚は卸売市場にて購入した。小型魚は三枚おろしにして小骨と皮を除いた筋肉部を均分して採取

した。マグロ・カジキ等はブロックから約300 g を採取した。総水銀を冷蒸気原子吸光法、メチル水銀をECD 検出器を用いたガスクロマトグラフ法、カドミウムを原子吸光法にて分析した。(分析：日本食品分析センター)

(ｲ) ICP-MS*1によるカドミウム分析システムの構築

魚介類試料をマイクロ波分解（パーキンエルマーMaltiwave 3000）し、ICP-MS（パーキンエルマーELAN DRC II）を用い、カドミウム111及び114を測定した。外部精度管理試験（FAPAS）によってシステムを検証した。

(ｳ) 魚肉中の水銀結合性タンパク質の精製

マグロ類、メカジキおよびキンメダイの普通筋および血合筋を遠心分画し、水溶性の筋形質タンパク質画分と不溶性の筋原繊維タンパク質画分における総水銀含量を測定した。

また、水銀結合性の筋原繊維タンパク質を酵素分解によって可溶化し、ゲル濾過およびイオン交換カラムで精製した。水銀結合性のタンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、ゲルを細切して水銀が含まれるタンパク質バンドを同定した。

ウ　研究結果

(ｱ) 魚介類に含まれる総水銀、メチル水銀およびカドミウムの現状把握

国内で流通する23種の魚介類の筋肉あるいは可食部中の総水銀およびメチル水銀含量を表3106-1および表3106-2に示した。総水銀レベルが顕著に高かった（＞0.4 μg/g）のは、キンメダイ（0.78±0.56 μg/g、最大値1.91 μg/g）大西洋産クロマグロ（0.42 ± 0.06 μg/g；最高値0.51 μg/g）、太平洋産クロマグロ（平均0.59 ± 0.34 μg/g；最高値1.08 μg/g）、太平洋産メバチ（0.98 ± 0.34 μg/g；最高値1.95 μg/g）、大西洋産クロカジキ（平均0.56 ± 0.05 μg/g；最高値0.62 μg/g）、太平洋産マカジキ（平均0.51 ± 0.08 μg/g；最高値0.64 μg/g）、大西洋産メカジキ（平均0.47 ± 0.24 μg/g；最高値0.82 μg/g）、およびメロ（0.57 μg/g）であった。その他の魚介類の総水銀およびメチル水銀含量はいずれもその最高値が日本の暫定的規制値（総水銀0.4 μg/g、メチル水銀0.3 μg/g）よりも低かった。

カツオの普通筋および血合筋を分けて分析した結果、総水銀含量は普通筋0.25 μg/g、血合筋0.35 μg/gで、血合筋のほうが普通筋よりも高レベルだった。シラス（カタクチイワシの稚魚）は全魚体を用いて分析した結果、総水銀、メチル水銀ともに検出下限0.01 μg/g 未満であった。カタクチイワシ成魚は総水銀含量0.03 μg/g、メチル水銀含量 0.01 μg/g で、シラスと比べわずかに水銀レベルが高かった。

キンメダイの組織別分布を調べた結果、筋肉では総水銀0.78 ± 0.56 μg/g、およびメチル水銀0.52 ± 0.38 μg/g、肝臓では3.51 ± 0.72 μg/g および1.12 ± 0.31 μg/g、卵巣では0.49 ± 0.26 μg/g and 0.29 ± 0.18 μg/g だった。また、スケトウダラ卵巣（＜0.01 μg/g、表3106-2）よりもキンメダイ卵巣のほうが、総水銀、メチル水銀のいずれも高かった。

キンメダイ、クロマグロ、およびメバチで高いレベルの水銀蓄積が認められたので、これらの魚種について体重との相関を調べた。図3106-1はキンメダイ20検体についての体重と水銀濃度の関係を示した。相関係数は総水銀0.862、メチル水銀0.812と、高い正の相関が認められた。水銀レベルが最も高かったのは体重1726 g の個体で、総水銀1.91 μg/g、メチル水銀1.37 μg/g だった。メバチ37検体、クロマグロ36検体においても同様に体重と総水銀およびメチル水銀レベルの間に高い正の相関が認められ、相関係数はメバチで0.852および0.824、クロマグロで0.920および0.929だった。メバチの最高値は87 kg の個体で総水銀1.95 μg/g およびメチル水銀1.33 μg/g、クロマグロの最高値は79 kg の個体で総水銀1.08 μg/g およびメチル水銀0.90 μg/g だった。

原子吸光法によるカドミウム分析の結果、135検体中のうち87検体は0.01 ppm 未満の検出限界以下であった。筋肉は0.01未満～0.11 ppm だった。

(ｲ) ICP-MS によるカドミウム分析システムの構築

テフロン耐圧容器に試料0.5 g、硝酸 5 ml および過酸化水素1.5 ml を入れ、1400W のマイクロ波にて 1 時間分解し、純水で100 ml に希釈し、試料液を調製した。検出下限0.2 ppb，定量下限0.5 ppb で検出できた。FAPAS による真度試験（魚肉缶詰0753、2005年）の結果、カドミウムの測定値は13.3 μg/g、（付与値12.9 μg/g）z スコア0.1で良好な真度が得られた。

(ｳ) 魚肉中の水銀結合性タンパク質の精製

クロマグロ筋肉中の水銀は大部分が筋原繊維タンパク質画分に存在し，その割合は全体の74-98%だっ

た。普通筋の筋形質タンパク質画分には４％，血合筋の筋形質タンパク質画分には12%分布していた。筋原繊維タンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し，スライスしたゲルを湿式分解後水銀分析することによって,水銀結合タンパク質を検出する手法を開発した。この方法で，水銀は主に筋原繊維タンパク質に検出された（図3106-2)。

筋原繊維タンパク質のミオシンから水銀を特異的に含むタンパク質を精製単離した。このタンパク質に結合した水銀はチオール還元剤処理によってタンパク質から容易に遊離した。

表3106-1　国産魚類中可食部の総水銀、メチル水銀、およびカドミウム含量

魚種	部位	体重（範囲）	総水銀含量（μg/g）		メチル水銀含量（μg/g）		カドミウム含量（μg/g）	
			平均値	最大値	平均値	最大値	平均値	最大値
キンメダイ	筋肉	1.3（0.28-2.6）kg	0.78±0.56	1.91	0.52±0.38	1.37	<0.01	0.01
	肝臓	2.5 kg（2.4-2.6）kg	3.51±0.72	4.05	1.12±0.31	1.47	2.78±0.64	3.36
	卵巣	2.3（1.8-2.6）kg	0.49±0.26	1.00	0.29±0.04	0.34	0.03±0.04	0.08
クロマグロ（大西洋産）	筋肉	21.8（6.0-39）kg	0.42±0.06	0.51	0.29±0.56	1.37		
クロマグロ（太平洋産）	筋肉	50.5（2.5-81）kg	0.59±0.34	1.08	0.49±0.31	0.90		
ミナミマグロ	筋肉	40.3（35-38）kg	0.27±0.04	0.32	0.19±0.02	0.21	<0.01	<0.01
メバチ（大西洋産）	筋肉	38.9（35-43）kg	0.27±0.01	0.28	0.19±0.01	0.20	0.02±0.00	0.02
メバチ（太平洋産）	筋肉	59.4（41-99）kg	0.98±0.34	1.95	0.69±0.23	1.33	0.03±0.00	0.03
クロカジキ（大西洋産）	筋肉	48.0（46-50）kg	0.56±0.05	0.62	0.24±0.21	0.25	0.01±0.01	0.02
マカジキ（大西洋産）	筋肉	71.3（70-75）kg	0.51±0.08	0.64	0.39±0.03	0.43	0.02±0.00	0.02
メカジキ（大西洋産）	筋肉	70.4（65-80）kg	0.47±0.24	0.82	0.34±0.21	0.69	0.08±0.02	0.11
カツオ	普通筋	3.63（3.61-3.65）kg	0.25	0.29	0.15	0.15	0.01	0.01
	血合筋	3.63（3.61-3.65）kg	0.35	0.37	0.21	0.22	0.03	0.03
マコガレイ	皮と筋肉	508（479-572）g	0.03±0.01	0.04	0.02±0.01	0.02	0.02±0.00	0.02
マアジ（大分県産）	筋肉	220（200-241）g	0.04±0.00	0.05	0.02±0.00	0.03	<0.01	<0.01
マアジ（鹿児島県産）	筋肉	165（149-176）g	0.02±0.01	0.03	0.02±0.00	0.02	<0.01	<0.01
マアジ（兵庫県産）	筋肉	150（140-159）g	0.02±0.00	0.03	0.01±0.01	0.02	<0.01	<0.01
マアジ（三重県産）	筋肉	123（107-132）g	0.04±0.00	0.04	0.02±0.00	0.02	<0.01	<0.01
サンマ	筋肉[1)]	171（163-179）g	0.07		0.04		<0.01	
アカカマス	筋肉[1)]	207（190-230）g	0.30		0.20		<0.01	
コチ	筋肉[1)]	463（380-563）g	0.17		0.11		<0.01	
シロギス	筋肉[1)]	90（78-98）g	0.07		0.06		<0.01	
マイワシ	筋肉[1)]	70（65-125）g	0.02		0.01		<0.01	
カタクチイワシ	ラウンド[2)]	19（16.4-20.3）g	0.03		0.01		0.08	
カタクチイワシ	ラウンド	0.07（0.0321-0.1524）g	<0.01		<0.01		<0.01	
アユ（養殖）	筋肉[1)]	120（107-134）g	0.04		0.03		<0.01	

1)7個体から採取した筋肉を混合したコンポジット試料

表3106-2　輸入水産物の総水銀、メチル水銀およびカドミウム含量

魚種	輸出国	部位	体重（範囲）	総水銀含量（μg/g）	メチル水銀含量（μg/g）	カドミウム含量（μg/g）	ダイオキシン換算＋コプラナPCB換算(pgTEQ/g)[4]
				平均値	平均値	平均値	平均値
カツオ	フィリピン	筋肉[1]	1.53（0.74-2.55）kg	0.05	0.03	0.03	0.034
	キリバス	筋肉[1]	1.30 （1.15-1.57）kg	0.04	0.03	0.03	0.037
ベニザケ	アメリカ	筋肉[1]	2.34（1.72-3.16）kg	0.03	0.02	<0.01	0.258
メロ	チリ	筋肉[1]	3.35（2.76-4.77）kg	0.57	0.31	<0.01	0.856
ミナミマグロ（畜養）	オーストラリア	筋肉[1]	27.0（22.5-31.5）kg	0.30	0.19	<0.01	2.325
クロマグロ（畜養）	イタリア	筋肉[1]	ND	1.46	1.02	<0.01	12.094
クロマグロ（天然）	イタリア	筋肉[1]	12.7（9-12）kg	0.97	0.56	<0.01	2.550
キハダ	韓国	筋肉[1]	21.3（16-25）kg	0.04	0.03	<0.01	0.023
メバチ	インドネシア	筋肉[1]	22.8（18-25）kg	0.47	0.31	<0.01	0.013
スケトウダラ	ロシア	卵巣2)	ND	<0.01	<0.01	<0.01	0.510
ヤリイカ	アメリカ	筋肉[3]	67（34-98）g	0.03	0.01	0.03	0.057
タラバガニ	アメリカ	筋肉[1]	ND	0.02	0.01	0.03	0.035

1)10個体から採取した筋肉を混合したコンポジット試料

2)90個体から採取した卵巣を混合したコンポジット試料

3)28個体から採取した筋肉を混合したコンポジット試料

4)水産庁2002、魚介類中のダイオキシン類の実態調査

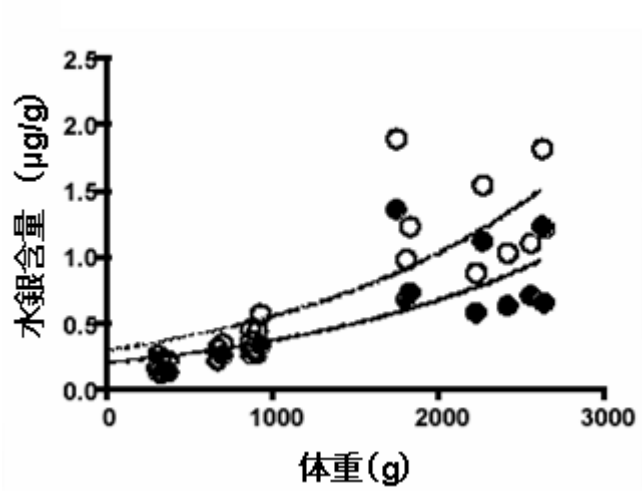


図3106-1　キンメダイ筋肉中の総水銀（●）およびメチル水銀（○）の体重プロット．相関係数はr=0.862（●），r=0812（○）

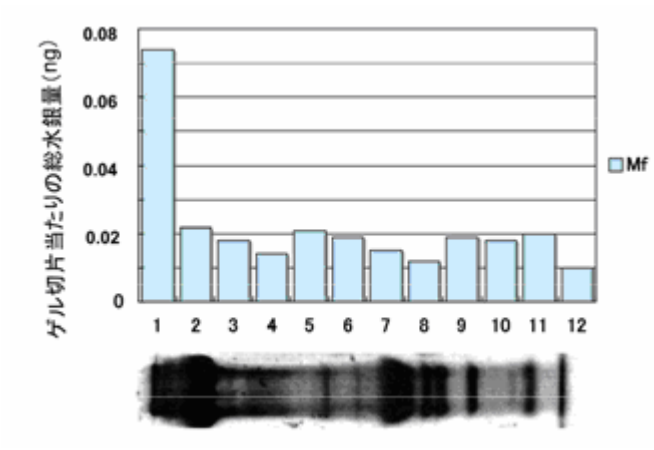


図3106-2　クロマグロ普通筋の筋原繊維タンパク質のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動による水銀結合タンパクの分離

*1：ICP-MS とは、分析法名で、誘導プラズマ質量分析法 inductively coupled plasma mass spectrometry の略称である。

エ　考　察

(ア) 魚介類に含まれる総水銀、メチル水銀およびカドミウムの現状把握

1974年の近海産魚介類の総水銀含量はアカカマス（平均0.07 μg/g、最高値0.31 μg/g)、アユ（平均0.07 μg/g、最高値0.36 μg/g)、カタクチイワシ（平均0.02 μg/g、最高値0.17 μg/g)、カタクチイワシ（しらす）（平均0.01 μg/g、最高値0.09 μg/g)、キス（平均0.06 μg/g、最高値0.31 μg/g)、コチ（平均0.15 μg/g、最高値0.54 μg/g)、マアジ（平均0.04 μg/g、最高値0.28 μg/g)、マイワシ（平均0.01 μg/g、最高値0.06 μg/g)、マコガレイ（平均0.05 μg/g、最高値0.25 μg/g）で、

30年前とほぼ同レベルだった。1980年マグロ・カジキ類の総水銀含量は太平洋産メバチ（平均0.63 μg/g、最高値2.12 μg/g）、太平洋産キハダ（平均0.19 μg/g、最高値0.48 μg/g）で、1980年、2003年のいずれでも水銀レベルはメバチで高く、キハダで低い傾向が認められた。体重と水銀レベルの相関はマグロ類で知られていた（農林水産技術会議.1980）が、今回キンメダイでも確認された。

(ｲ) ICP-MSによるカドミウム分析システムの構築
特になし。

(ｳ) 魚肉中の水銀結合性タンパク質の精製

クロマグロ、メバチ，メカジキおよびキンメダイ筋肉中の水銀は大部分が筋原繊維タンパク質画分に存在し，その中のミオシン S 1 成分に局在していた。ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離されたタンパク質バンドから，水銀結合タンパク質を検出する手法によって，水銀は主に筋原繊維タンパク質に検出された。筋原繊維タンパク質のミオシン S 1 画分精製単離したタンパク質に結合した水銀は、チオール還元剤処理によって遊離した。以上の結果から，魚肉中のメチル水銀は筋原繊維タンパク質の特定のシステイン残基に特異的に配位することが明らかとなった。このタンパク質が魚肉のメチル水銀の蓄積，代謝および毒性軽減に主要な役割を果たすことが推定される。

オ　今後の課題

(ｱ) 魚介類に含まれる総水銀、メチル水銀およびカドミウムの現状把握

メバチ、クロマグロは消費量も多く水銀レベルが高く、特に大型魚の水銀レベルは個体差が大きい。迅速で安価な水銀分析法が開発されれば、マグロ類にもCodexガイドライン値（メチル水銀1 ppm）を適用し、規制値を超える魚を流通させない措置が可能となる。

(ｲ) ICP-MSによるカドミウム分析システムの構築

カドミウム含量が高い魚類肝臓、無脊椎動物等のカドミウム含量、およびカドミウム含量の低い魚肉中の正確な定量等、暴露評価に資する基礎データを蓄積する。

(ｳ) 魚肉中の水銀結合性タンパク質の精製

水銀結合性タンパク質を動物試験用に大量に調整し、これを用いた毒性評価を行う。

カ　要　約

(ｱ) 魚介類に含まれる総水銀、メチル水銀およびカドミウムの現状把握

魚介類23種の総水銀，メチル水銀およびカドミウムを測定し，マグロ類，カジキ類，およびキンメダイの筋肉および肝臓に 1 ppm 以上の水銀が含まれることを明らかにした。

(ｲ) ICP-MSによるカドミウム分析システムを構築した。

(ｳ) 魚肉中の水銀結合性タンパク質の精製

メチル水銀が特異的に配位する筋原繊維タンパク質を同定し，魚肉におけるタンパク態メチル水銀の化学形態を解明した。

キ　引用文献

厚生労働省2004a. 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会乳肉水産食品部会資料，平成16年8月17日，東京.
厚生労働省2004b. 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会乳肉水産食品部会資料，平成16年11月24日，東京.
農林水産技術会議事務局 1980. マグロ水銀含有物質起因とその拮抗物質に関する研究報告.
山下由美子2004. 魚介類に含まれる水銀の蓄積機構，養殖，508，88-90.
Y. Yamashita et. al. 2005. Total mercury and methyl mercury levels of commercially important fish and invertebrates in Japan. *Fisheries Science*, 71（5）, 1029-1035.
水産庁1974. 魚介類等の水銀調査結果について.

研究担当者（山下由美子*）

7 食品中に含まれる鉛等重金属の実態解明

ア　研究目的

Codex では鉛の食品中最大基準値設定作業が進んでいる。日本ではかつて鉛の放出源であった有鉛ガソリンや有鉛農薬の規制、およびハンダ缶の改良などにより、食品の鉛による汚染は低減されていると推察されるが、最近の含有量の実態はほとんど明らかにされていない。安全を確認するためにも、食品中に含まれる鉛に由来する健康リスクを検討する必要がある。乳幼児は体重あたりの食品摂取が多い上、鉛の吸収率が高く、排出率は低い。関連の調査の結果もふまえ、多くの測定結果から乳幼児を対象とし

て農産物からの経口暴露評価を行った。

イ　研究方法

(ア) Codex における基準値設定作業では、鉛において基準値案に対する定量下限の問題が指摘されている。また、外部精度管理事業（技能試験、Proficiency Testing）における集計結果などからも、食品中に含まれる極微量な鉛は精確な分析が難しい元素に位置づけられる。鉛の定量にあたっては、組成認証標準物質を使って分析手法の妥当性の確認を行うとともに、信頼性の高いデータを出すために、食品に含まれる汚染金属を対象とした外部精度管理事業へ参加した。鉛の測定には誘導結合プラズマ質量分析法（ICP-MS）を使用した。また、共存元素の把握には誘導結合プラズマ発光分析法（ICP-AES）を使用し、多元素を同時に測定した。測定用試料溶液調製法は、テフロン密閉式容器を用いるマイクロ波湿式分解による分析手法を検討した。

(イ) 妥当性を確認した方法で、市販されている乳幼児を対象とする食品を測定を行った。経口暴露評価では多くの試料の測定結果に基づく必要がある。農林水産省が実施した「農産物等に含まれる鉛の調査」のデータも活用した。

ウ　研究結果

(ア) 鉛の定量下限（LOQ）は、試料によっても異なるが、乾物状態のものでは概ね0.02 mg/kg であった。鉛と同じ前処理で同時に測定が可能で、同じく Codex で基準値設定作業が進んでいるカドミウムについても測定対象としたところ、鉛およびカドミウムとも、認証組成標準物質の認証値または参考値に対しても（表3107-1）、また外部精度管理事業への参加でも良好な結果が得られた（表3107-2）。

表3107-1　認証組成標準物質の測定結果

認証組成標準物質	Pb		Cd	
	認証値[1)]	測定値[2)]	認証値[1)]	測定値[2)]
Whole Milk Powder (NIST)	0.11±0.05	0.09±0.02	(0.0002)[3)]	-
Typical Japanese Diet (NIES/NIRS)	(0.62)[3)]	0.57±0.06	0.069±0.009	0.062±0.004
Brassica Oleracea (NRCCRM)	0.28±0.09	0.31±0.04	0.029±0.006	0.035±0.003
Spinach Leaves (NIST)	(0.2)[3)]	0.29±0.05	2.89±0.07	2.73±0.06
Tea (NRC)	4.4±0.2	4.1±0.4	0.057±0.008	0.054±0.005
Bush Branches and Leaves (NRC)	47±2	46.5±0.9	(0.38)[3)]	0.80±0.01
Rice Flour Unpolished No.10a(NIES)	-	0.96±0.04	0.023±0.003	0.027±0.001
Rice Flour Unpolished No.10b(NIES)	-	1.12±0.04	0.32±0.02	0.28±0.00
Rice Flour Unpolished No.10c(NIES)	-	0.58±0.02	1.82±0.06	1.74±0.01

1) 認証値±不確かさ（mg/kg dry weight）

2) 3点併行分析の結果（平均±標準偏差）

3) 参考値

表3107-2　外部精度管理事業への参加結果

Proficiency Testing 試料	Pb		Cd	
	付与された値[1)]	測定値[2)]	付与された値[1)]	測定値[2)]
Whole Milk Powder (FAPAS, CSL)	0.188±0.078	0.202±0.010	0.044±0.020	0.041±0.010
Whole Milk Powder (FAPAS, CSL)	0.104±0.046	0.122±0.015	0.046±0.020	0.045±0.003
Soya Flower (FAPAS, CSL)	0.494±0.176	0.482±0.027	0.224±0.090	0.219±0.012
Vegetable Puree (FAPAS, CSL)	0.327±0.124	0.29±0.05	0.191±0.078	0.192±0.004
Canned Fish (FAPAS, CSL)	(0.0023)	0.0055±0.0005	0.0191±0.0085	0.0199±0.0008

1) 付与値± z スコア 2 （mg/kg raw weight）

2) 3点併行分析の結果（平均±標準偏差）

（イ）市販されている食品の測定結果は、水分含有量の高い試料も、乾物およびフリーズドライ等の試料も、流通している状態における重量あたりの含有量として算出した。鉛およびカドミウムとも現在設定中の Codex 基準値を超えるような試料はなかった（表3107－3）。１～２歳の年齢における農産物からの鉛摂取量*1は、成人に対して設定されている体重1 kg 当たりおよび１週間当たりの耐用許容量（PTWI、25 mg/kg bw/week）*2に対し、測定値の取り扱いが<LOQ＝LOQ の場合には26.1%、<LOQ＝0の場合には2.4%で、食品群別の鉛摂取量に対する内訳は、それぞれ図3107-1と図3107-2となった。

*1：平成13年国民栄養調査結果（厚生労働省）による１～２歳の食品群別摂取量、および１～２歳の男女の体重の平均値により算出した。食品群の分類もこの調査の分類による。
*2：子供の PTWI は設定されていないため、成人の値を使用。

表3107-3　乳幼児対象の食品における鉛測定結果

	Pb [1)]		
	Av.	Min.	Max.
粉ミルク	0.007	0.003	0.010
離乳食など			
野菜主体	0.009	0.001	0.045
野菜プラス肉魚	0.018	0.003	0.045
果汁	0.005	0.000	0.011
スープ，ご飯のもと	0.014	0.001	0.032
おかゆ（具各種）	0.019	0.012	0.026
お茶（麦茶など）	0.031	0.005	0.073
菓子類	0.010	0.003	0.040

1）含有量は mg/kg raw weight （流通している状態の重量あたり）

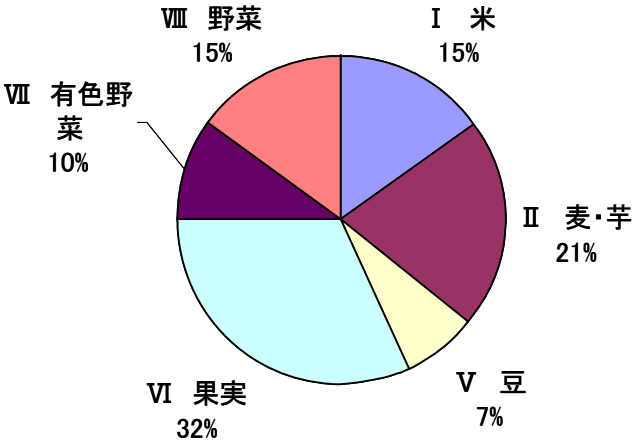


図3107-1　１～２歳の年齢における農産物からの鉛摂取寄与率（<LOQ＝LOQで算出）

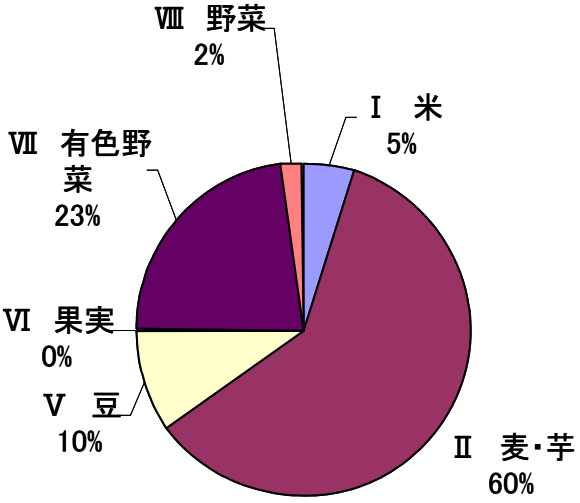


図3107-2　１～２歳の年齢における農産物からの鉛摂取寄与率（<LOQ＝0で算出）

エ　考　察

(ｱ) 乳製品や大豆など脂質の多い食品において、湿式分解による前処理は、長時間を要するなど一般に困難であったが、２段階でマイクロ波分解を行うことにより改良することができた。鉛以外にもカドミウムや多くの無機質測定のための前処理法としても適用が可能である。

(ｲ) 本課題では、乾物やフリーズドライ等の試料も流通している状態における重量あたりの含有量として算出した。一方、Codex の食品別基準値案は、例えば粉ミルクでは調製後の状態で0.02 mg/kg と設定されており、農産物は水分込みの重量あたりで0.1～0.3 mg/kg となっている。これらを勘案すると、鉛は基準値案に対して十分低い値であった。乳幼児を対象とした食品の測定結果は、項目としては、1980年にまとめられた厚生省の調査結果と直接比較できない。しかし、かつて鉛の放出源であった有鉛ガソリンや有鉛農薬の規制により、原料の農産物については鉛の含有量が以前の調査結果より下がっていると判断された。

乳幼児は体重あたりの食品摂取が多いため、成人で設定されている鉛の PTWI に対する摂取割合は高くなる。測定値の取り扱いが<LOQ＝LOQ の場合には、<LOQ＝0とする取り扱いなどより摂取寄与率が多く見積もられるが、このときの成人における農産物からの鉛摂取は PTWI の9.9%であるのに対して、１～２歳の年齢における農産物からの鉛摂取は成人で設定されている PTWI に対して26.1%となった。

なお、全年齢の平均の食品群別摂取量と比較すると、１～２歳の年齢では果実（生果のほかに缶詰・果汁飲料等を含む）の摂取量が相対的に高いため、果実からの鉛の摂取寄与率が全年齢の結果より高くなる。ただし、果実に含まれる鉛は多くが LOQ 以下であったため、<LOQ＝0として取り扱う場合は果実の寄与率が低く、農産物からの鉛摂取も成人の PTWI に対する割合も2.4%と低くなった。代わりに、食品群別では麦・芋類からの鉛摂取が大半を占めることとなる。

オ　今後の課題

諸外国の調査などからも鉛の摂取は主に野菜等の農産物からとされており、農林水産省でも農産物の調査が行われたが、安全を確認するためにも、魚介・肉・卵および乳幼児で摂取量が多い乳類等の調査も重要と考えられる。

カ　要　約

(ｱ) 食品に含まれる鉛の分析法を検討したところ、認証組成標準物質の認証値または参考値に対して、良好な結果が得られた。また、食品に含まれる汚染金属を対象とした外部精度管理事業へ参画し、鉛についても良好な結果を得た。

(ｲ) 妥当性を確認した分析方法で乳幼児対象の食品を測定したところ、Codex により設定されている鉛の食品別基準値案に対し、問題となる量が検出された試料はなかった。１～２歳の年齢における農産物からの鉛摂取は、成人に対して設定されている PTWI に対し、<LOQ＝LOQ とした場合に26.1%であった。

研究担当者（進藤久美子*、内藤成弘、山田友紀子）

8　米同一品種のDNA解析による産地判別

ア　研究目的

改正 JAS 法の施行にともない、米の品種、産地、産年の包装での表示が義務づけられ、内容物と表示との異同を科学的に確認する技術の開発が必要とされている。これまでに、米の品種については、DNA 判別による技術が開発されているが、産地については、元素同位対比による遠隔地間の識別が可能になった以外は実用的な判別技術が開発されていない。同一品種の米でも、産地によって食味や価格が異なっており、DNA 解析によって産地の判別が可能であるかどうかを検討する必要がある。本研究では、DNA 解析を中心に、米の産地間差異の検討を行い、PCR 法や理化学的フィンガープリント等を用いる産地判別技術を開発する。

イ　研究方法

(ｱ) 理化学的フィンガープリント

試料は新潟県産、茨城県産（２産地)、愛知県産の4種類の産地の異なるコシヒカリを用いた。アミロース含量は Juliano の比色法によって測定した。蛋白質含量はケルダール法によって測定した。糊化特性は、精米粉末3.5 g を試料とし、ニューポートサイエンティフィック社製ラピッドビスコアナライザーを使用して最高粘度、最低粘度等を測定した。米飯物性は、精米10 g を電気釜を用いてカップ炊飯し、その3粒を試料として全研製テクスチュロメーターを使用し、硬さ、粘り、付着と硬さの比率を測定した。

(ｲ) 同一品種の原種同士の DNA 塩基配列の相違に基づく PCR 法

全国の異なる33産地のコシヒカリ原種あるいは原々種を収集した。これらの精米試料粉末から CTAB 法によって鋳型 DNA を抽出・精製し、約400種類の市販ランダムプライマーを用い、RAPD 法 PCR において試料間の差異の出現するプライマーを検索した。識別性の現れた増幅 DNA を電気泳動ゲルから切り出し、ガラスビーズ法によって DNA を回収し、その塩基配列を決定して STS 化プライマーを設計した。

(ｳ) 同一品種の同質遺伝子系統の DNA 塩基配列の相違に基づく PCR 法

いもち病抵抗性の同質遺伝子系統のコシヒカリ BL は 8 種類を新潟県農業総合研究所から、ササニシキ BL は 7 種類を宮城県古川農業試験場から分譲を受けた。これらの試料米精米粉末から CTAB 法によって DNA を抽出・精製し、当研究室で開発済みの各種 STS 化プライマーおよび市販ランダムプライマーを用いて PCR を行い、一般コシヒカリあるいは一般ササニシキおよび BL 系統間の識別性について検討した。有望な識別バンドから DNA を切り出してシークエンスし、その塩基配列に基づいて STS 化プライマーを設計した。

ウ　研究結果

(ｱ) 理化学的フィンガープリント

4 種類の産地の異なるコシヒカリについて、アミロース含量、蛋白質含量、糊化特性および米飯物性の測定結果を表3108-1に示す。アミロース含量は16.8～19.7%、蛋白質含量は5.0～6.2%、糊化最高粘度は344～395RVU、同最低粘度は122～147RVU、米飯の硬さは2.31～4.73 kgf、米飯の粘りは0.54～1.43 kgf、米飯の付着／硬さは0.078～0.086、の範囲であった。表3108-1に示すように、同一県内で異なる産地の試料間の相違が県産の異なる試料間の相違を上回っていた。

表3108-1　異なる産地のコシヒカリの理化学特性測定結果

	産地	成分分析		糊化特性		米飯物性		
No		ｱﾐﾛｰｽ	蛋白質	最高粘度	最低粘度	硬さ	粘り	付着／硬さ
1	新潟	17.0	0.1	344RVU	122RVU	2.54kgf	0.62kgf	0.086
2	茨城A	19.7	5.5	368	136	4.73	1.43	0.080
3	茨城B	17.0	5.4	380	145	2.47	0.64	0.086
4	愛知	16.8	6.2	395	147	2.31	0.54	0.078

(ｲ) 同一品種の原種同士の DNA 塩基配列の相違に基づく PCR 法

開発した DNA マーカーを使用し、産地ごとのコシヒカリ30点について、PCR を行った結果を図3108-1に示す。また、32産地の原種に関する PCR の結果の一覧を表3108-2に示す。これらの結果から、PCR によるコシヒカリの原種同士の識別が可能になった。

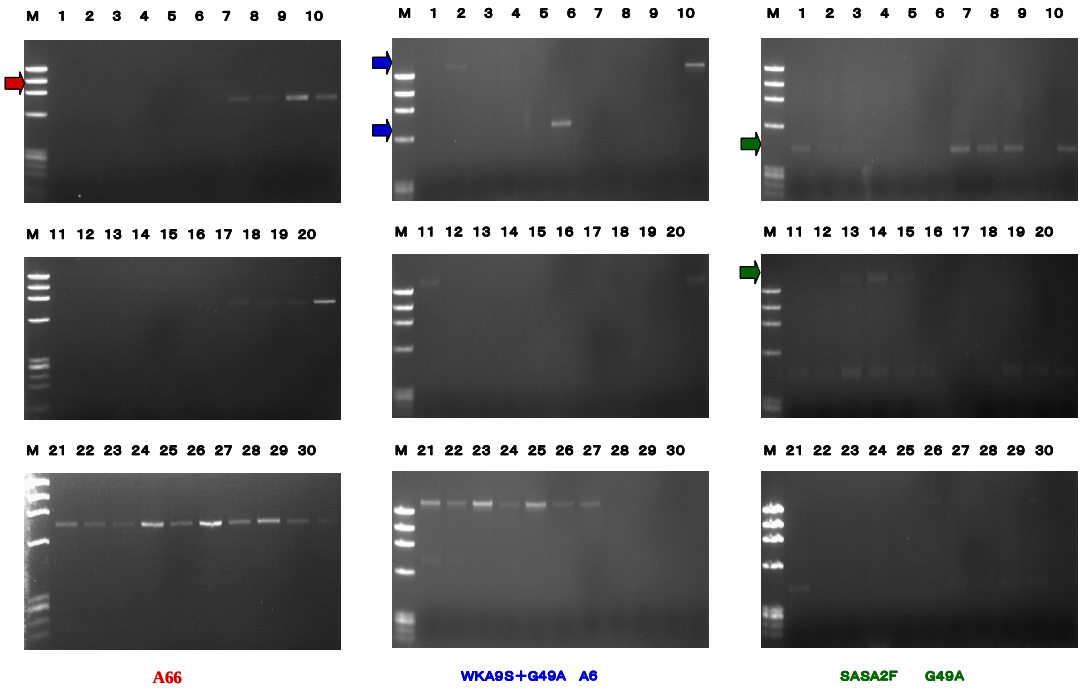


図3108-1　コシヒカリの原種同士の識別マーカーの例

（M：DNA 分子量マーカー、1～30各原種の産地）

表3108-2　異なる産地のコシヒカリ原種同士の PCR 結果

産地/プライマー	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
1	−	+	+	−	+	+	+	−	±	+
2	+	+	+	−	+	−	+	−	±	+
3	−	+	+	−	+	+	−	−	±	+
4	+	+	+	−	+	+	−	−	±	+
5	+	±	+	−	+	−	−	−	−	+
6	−	+	−	−	−	+	−	−	−	+
7	+	+	+	−	+	+	−	−	−	+
8	−	−	±	−	+	+	−	+	+	+
9	+	−	+	−	−	−	−	+	+	−
10	+	−	+	−	+	+	+	+	+	−
11	−	+	+	+	−	−	−	−	−	+
12	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+
13	+	±	±	±	+	−	−	−	−	+
14	−	±	+	±	+	+	−	−	−	+
15	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+
16	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+
17	+	+	±	+	−	−	−	−	+	+
18	−	−	±	−	−	−	+	−	±	+
19	±	−	±	+	+	+	+	−	−	+
20	+	−	+	−	+	+	−	−	−	±
21	+	−	+	−	−	+	+	−	−	+
22	+	±	+	+	−	+	−	−	−	+
23	−	+	±	+	+	+	+	−	+	+
24	−	+	+	+	+	+	−	+	+	+
25	−	+	+	+	+	+	−	+	−	+
26	−	+	+	+	+	−	+	+	+	±
27	−	+	±	+	+	+	+	+	+	±
28	−	+	±	−	+	−	−	−	+	±
29	+	−	−	−	+	−	−	−	+	±
30	−	−	−	−	+	+	−	−	+	−
31	+	+	−	+	+	+	−	+	−	+
32	−	+	−	−	+	+	−	+	−	+

（注）1～32：産地番号、a～j：プライマーの種類

(ｳ) 同一品種の同質遺伝子系統の DNA 塩基配列の相違に基づく PCR 法

図3108-2に示すように、稲のいもち病性抵抗性を導入した同質遺伝子系統が全国で育成されつつある。本研究では、RAPD-STS プライマーを用いて検討した結果、図3108-3および表3101-3に示すように、識別が可能となった。これらの DNA マーカーを用いて、公表遺伝子型と照合した結果、表3108-4に示すように、いもち病抵抗性とよく一致していた。

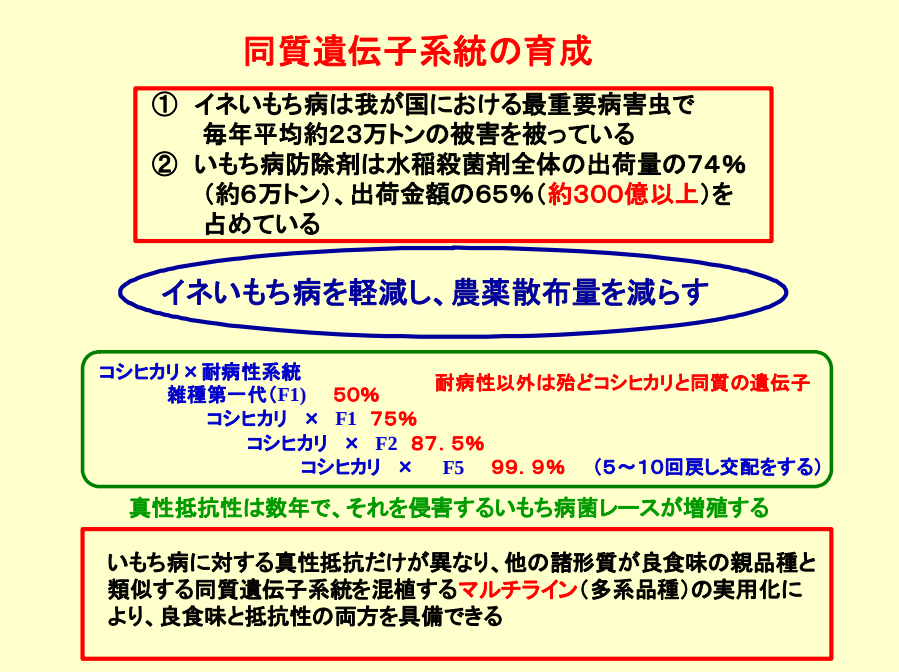


図3108-2　同質遺伝子系統の育成方法とマルチライン化

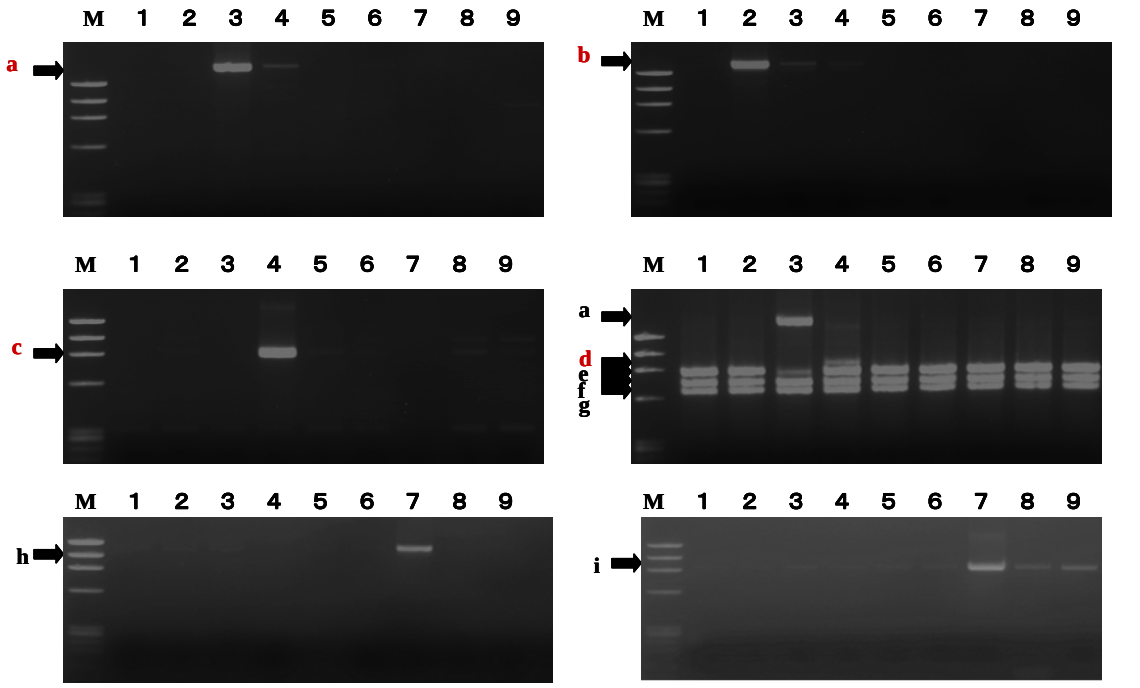


図3108-3　PCR による新潟コシヒカリ（罹病性）と BL 同質遺伝子系統の識別例

表3108-3　各種の BL 同質遺伝子系統の識別結果のまとめ

試料名/プライマー	遺伝子型	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k
		1500bps	1613bps	870bps	860bps	400bps	270bps	870bps	310bps	870bps	970bps	320bps
標準コシヒカリ		−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
新潟BLコシヒカリ1号	*Pia*	+	−	−	−	−	+	−	−	+	−	+
新潟BLコシヒカリ2号	*Pii*	−	+	−	−	−	+	−	−	+	−	+
新潟BLコシヒカリ3号	*Pita-2*	−	−	+	+	+	−	−	−	+	−	−
新潟BLコシヒカリ4号	*Piz*	−	−	−	−	−	+	−	+	+	−	+
新潟BLコシヒカリ5号	*Pik*	−	−	−	−	−	+	−	−	+	−	+
新潟BLコシヒカリ6号	*Pik-m*	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−
新潟BLコシヒカリ7号	*Pizt*	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−
新潟BLコシヒカリ8号	*Pib*	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	−
ササニシキBL8号	*Pii,Pia*	+	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−
ササニシキBL1号	*Pik,Pia*	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
ササニシキBL2号	*Pik-m,Pia*	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−
ササニシキBL3号	*Piz,Pia*	+	−	−	−	−	+	−	−	+	−	−
ササニシキBL6号	*Pita,Pia*	+	−	−	+	+	−	−	−	+	−	−
ササニシキBL5号	*Pita-2,Pia*	+	−	+	+	+	−	−	−	+	−	−
ササニシキBL4号	*Piz-t,Pia*	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
ササニシキBL7号	*Pib,Pia*	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
日本晴関東BL1号	*Piz*	−	−	−	−	−	+	−	+	+	+	+
日本晴関東BL2号	*Pii*	−	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−
日本晴関東BL3号	*Piz-t*	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+
日本晴関東BL4号	*Pita-2*	+	−	+	+	−	−	−	−	+	−	−
日本晴関東BL5号	*Pik*	−	−	−	−	−	−	−	±	−	−	−
日本晴関東BL6号	*Pib*	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	−
コシヒカリ富山BL1号	*Piz-t*	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	+
コシヒカリ富山BL2号	*Pita-2,Pii*	−	+	+	+	+	−	−	−	+	−	−
コシヒカリ富山BL3号	*Pib*	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
コシヒカリ富山BL4号	*Pik-p*	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
コシヒカリ富山BL5号	*Pik-m*	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−

表3108-4　本研究で開発した各種の DNA マーカーと各品種公表遺伝子型との関係

試料名/プライマー	遺伝子型	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
		1500bps	1613bps	870bps	860bps	400bps	270bps	870bps	310bps	870bps	970bps
ひとめぼれ	*Pii*	−	+	−	−	−	−	+	+	+	+
まなむすめ	*Pii*	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−
キヌヒカリ	*Pii*	−	±	−	−	−	−	−	−	+	+
ななつぼし	*Pii*	+	+	−	−	−	−	+	−	+	−
こいむすび	*Pii*	−	+	−	−	−	−	−	+	+	−
たきたて	*Pii*	+	+	−	−	−	−	−	+	+	−
ゆめさんさ	*Pii*	−	+	−	−	−	−	−	+	+	−
かけはし	*Pii*	−	+	−	−	−	−	−	+	+	−
たかねみのり	*Pii*	−	±	−	−	−	−	−	+	+	−
月の光	*Pii*	−	+	−	−	−	−	−	−	+	−
ササニシキ	*Pia*	+	−	−	−	−	−	+	+	+	−
ゆきひかり	*Pia*	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−
彩	*Pia*	+	−	−	−	−	−	−	+	+	−
ヤマビコ	*Pia*	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−
こがねもち	*Pia*	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−
アキヒカリ	*Pia*	+	−	−	−	−	−	−	+	+	−
キヨニシキ	*Pia*	+	−	−	−	−	−	−	+	+	−
あきたこまち	*Pia,Pii*	+	+	−	−	−	±	+	+	±	−
ミネアサヒ	*Pia,Pii*	+	+	−	−	−	+	−	+	+	+
ヒノヒカリ	*Pia,Pii*	+	±	−	−	−	−	−	−	+	+
つがるロマン	*Pia,Pii*	+	+	−	−	−	−	−	+	+	−
はなぶさ	*Pia,Pii*	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
ゆめあかり	*Pia,Pii*	+	−	−	−	−	−	−	+	+	−
ちゅらひかり	*Pia,Pii*	+	+	−	−	−	±	−	+	+	−
はえぬき	*Pia,Pii*	+	−	−	−	−	±	−	+	+	−
ハナエチゼン	*Piz*	−	−	−	−	−	+	−	+	+	−
日本晴	*Pik-s,Pia*	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
きらら３９７	*Pii,Pik*	−	±	−	−	−	−	±	−	−	−
あきほ	*Pii,Pia,Pik*	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−
ほしのゆめ	*Pii,Pia,Pik*	+	+	−	−	−	±	+	+	−	−
ゆきまる	*Pii,Pia,Pik*	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−
ほしたろう	*Pii,Pia,Pik*	+	+	−	−	−	−	+	−	−	−
マンゲツモチ	*Pik*	−	−	−	−	−	−	−	+	±	−
新潟早生	*Piz*	−	−	−	−	−	+	−	+	+	−
ナツヒカリ	*Piz*	−	−	−	−	−	+	−	+	+	−
ヤマヒカリ	*Pita-2*	−	−	+	±	−	−	−	−	−	−
レイホウ	*Pita-2*	±	−	+	±	−	−	−	−	+	−
サイワイモチ	*Pita-2*	+	−	+	+	+	−	−	±	+	±
おくのむらさき	*Pib*	+	−	−	−	−	−	−	+	+	+
ふくひびき	*Pib*	±	−	−	−	±	−	−	+	+	−

エ　考　察

理化学的フィンガープリントの場合、同一県内で異なる産地の試料間の相違が県産間の相違を上回っており、食味評価や利用適性の推定のためには有用であるが、産地判別には不適当と考察した。

同一品種の原種同士のDNA塩基配列の相違に基づくPCR法では、コシヒカリの32産地の原種同士の差異を識別できるDNAマーカーを開発することにより、原理的に産地の識別の可能性が示された。しかし、原種同士の差異はきわめて微妙であり、キット等による実用化にはかなりの困難が伴うと考えられた。

同一品種の同質遺伝子系統のDNA塩基配列の相違に基づくPCR法の場合、いもち病抵抗性に着目したDNAマーカーを開発することにより、原種同士の識別よりも明瞭な識別が可能であり、判別用キットの開発等、産地判別の実用化の可能性があると考えられた。

全国で、ひとめぼれ、日本晴、あいちのかおり等の主要品種のBL系統が育成されつつあるので、本研究で用いた産地判別は、今後、他の品種にも適用の可能性が考えられる。

また、BLの配合割合を、地域や産年で変えれば、県産のみならず、「魚沼地域」や「平成17年産」などの判別も可能となる技術である。

オ　今後の課題

理化学的フィンガープリントは、今回の産地判別には不適当であったが、対象とする米試料の食味評価や利用適性の推定には有用な手段である。

同一品種の原種同士のDNA塩基配列の相違に基づくPCR法は原理的な識別可能性が明らかにされた。

同一品種の同質遺伝子系統のDNA塩基配列の相違に基づくPCR法は明瞭な識別性が認められたので、平成17年度から、BLに全面作付け転換を行う新潟県産コシヒカリを対象に、実用的な判別キットの開発に取り組む。

カ　要　約

米の産地判別技術の開発に取り組んだ。①理化学的フィンガープリントは産地判別には不適当であった。②同一品種の原種同士のDNA塩基配列の相違に基づくPCR法では、コシヒカリの32産地の原種同士の差異を識別できるDNAマーカーを開発することにより、原理的に産地の識別の可能性が示されたが、原種同士の差異はきわめて微妙であり、キット等による実用化にはかなりの困難が伴うと考えられた。③同一品種の同質遺伝子系統のDNA塩基配列の相違に基づくPCR法の場合、いもち病抵抗性に着目したDNAマーカーを開発することにより、原種同士の識別よりも明瞭な識別が可能であり、コシヒカリとササニシキの同質遺伝子系統を識別することが可能になった。今後、判別用キットの開発等、実用化の可能性があると考えられた。

キ　引用文献

大坪研一・中村澄子・星　豊一・松井崇晃・石崎和彦 2004. 稲の同質遺伝子系統識別方法及び当該識別技術を利用した米の産地識別方法. 日本特許. 特開2004-141079、公開日：2004年5月20日

研究担当者（大坪研一*、中村澄子）

9　米のDNA品種判別法の試験室間共同試験による妥当性確認

ア　研究目的

当研究室では、STS-RAPD法による米のDNA品種判別技術を開発した。本研究では、この技術について、世界的に信頼される分析データの基盤を構築するために、各試験研究機関で使いやすいプライマーセットを開発し、信頼できる試料と方法による試験室間共同試験を行い、妥当性の確認を行う。

イ　研究方法

(ｱ) PCR用の有用プライマーの開発

a RAPD法による有用マーカーの探索

市販ランダムプライマーを用いるRAPD法により、識別用好適マーカーを選抜した。

b プライマーのSTS化とデータベースの拡充

RAPD法で見出した好適識別バンドのDNAをクローニングして塩基配列を決定し、それに基づいてSTSプライマーを開発した。種苗管理センターと共同で、STS-RAPD法による登録品種の識別データベース作成を試みた。

(ｲ) 新潟コシヒカリBLの識別用マーカーの開発

a RAPD法による探索

各種の新潟コシヒカリBLを試料に、RAPD法によって一般コシヒカリおよびBL相互の識別性の高いプライマーを探索した。

b 公表抵抗性遺伝子からのマーカー開発

従来の研究報告で公表されているいもち病抵抗性

遺伝子のマーカーによる RAPD を行い、識別性の高いバンドの DNA をクローニングし、STS 化プライマーを設計した。

c 実用的マルチプレックスプライマーセットの開発

上記 a および b で開発したプライマーを配合して複数のプライマーを同時使用するマルチプレックスプライマーセット開発を試みた。

(ｳ) プライマーセットの開発と試験室間共同試験

a 4 種類のプライマーセットの開発

作付け上位10品種および新潟コシヒカリ BL（4 種類のブレンド）を試料とし、これらを識別できる 4 種類のプライマーセットの開発を試みた。

b 試験室間共同試験

全国の独法、公立機関、民間機関32機関と共同で、上記 4 種類のプライマーセットによる、11品種の識別の共同試験を開始した。

ウ 研究結果

(ｱ) STS-RAPD 法による登録品種の判別データベースの拡充

新たに開発したプライマーを加えて10種類の STS 化プライマーおよび 6 種類のいもち病真性抵抗性遺伝子由来のプライマーを使用し、種苗管理センターと共同で、STS-RAPD 法による135点の登録品種の識別データベースを作成した。その一部を表3109-1に示す。

(ｲ) 新潟コシヒカリ BL の識別用プライマーの開発

各種新潟コシヒカリ BL のいもち病抵抗性遺伝子 *Pia*、*Pii*、*Pita-2*、*Piz*、*Pik-m* に対応する識別用プライマーを開発した。マッピングの結果を図3109-1に示す。これらを基に、実用的マルチプレックスプライマーセットを開発し、タカラバイオ社から市販を開始した。マルチプレックス判別の例を図3109-2に示す。

表3109-1 開発した STS 化プライマーによる登録品種の識別データベースの一部

		P5	E30	WKA9	B43	M11	G22	G28	F6	B1	M2CG
1	黄金晴	+	−	+	+	+	−	±	+	+	±
2	ながのほまれ	+	−	±	+	+	−	±	−	+	+
3	むつかおり	+	+	−	+	+	−	+	±	+	+
4	しまひかり	−	−	+	+	+	−	±	+	+	+
5	コガネヒカリ	+	−	−	+	+	−	−	−	+	+
6	みちこがね	+	+	−	+	+	−	−	−	+	−
7	ともひかり	+	−	−	+	+	−	±	+	+	+
8	キタアケ	+	+	−	+	+	−	+	±	+	+
9	ナツヒカリ	+	−	+	+	+	−	+	±	−	−
10	若水	−	−	−	+	+	−	±	+	+	+
11	ゆきひかり	+	−	−	+	+	−	+	±	+	+
12	能登ひかり	+	+	−	+	+	−	−	±	+	−
13	月の光	+	−	+	+	+	−	−	+	+	−
14	チヨニシキ	+	−	−	+	+	−	+	−	+	+
15	むつほまれ	+	+	±	+	+	−	+	+	+	+
16	ミナミヒカリ	+	−	−	+	+	−	−	−	+	+
17	はなの舞い	+	−	+	−	+	+	+	−	−	−
18	あいちのかおり	−	+	±	−	+	−	−	−	−	+
19	朝の光	−	−	±	−	−	−	+	+	+	−
20	きらら397	−	−	+	−	−	+	+	−	−	+
21	キヌヒカリ	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−
22	つがるおとめ	±	+	−	−	−	−	+	−	−	+
23	初夢	+	−	−	+	−	−	−	+	+	+
24	吉備の華	+	−	−	+	+	−	−	−	+	+
25	ゆきの精	+	−	−	+	+	−	+	+	+	+
26	ヒノヒカリ	+	−	−	−	+	+	−	−	+	+
27	葵の風	−	−	−	−	+	−	−	+	+	−
28	ひとめぼれ	+	−	+	+	+	+	+	−	±	+
29	ユメヒカリ	+	−	−	±	+	−	+	−	±	−
30	ときめき35	±	+	+	−	+	−	−	−	+	−
31	彩	+	+	−	+	−	−	−	±	+	+
32	どまんなか	+	−	−	−	+	−	+	−	+	+
33	はえぬき	+	−	+	−	+	−	±	−	−	+
34	あかね空	+	−	−	+	+	+	−	±	+	−
35	ハナエチゼン	+	−	−	−	+	−	+	−	−	+
36	吟おうみ	±	−	−	+	+	−	+	+	+	−
37	夢ごこち	+	−	−	+	+	+	+	−	−	−
38	わせじまん	±	−	−	−	+	−	+	+	+	−
39	エルジーシー1	+	−	−	+	−	−	−	+	+	+
40	かけはし	−	+	+	+	−	+	+	+	−	+

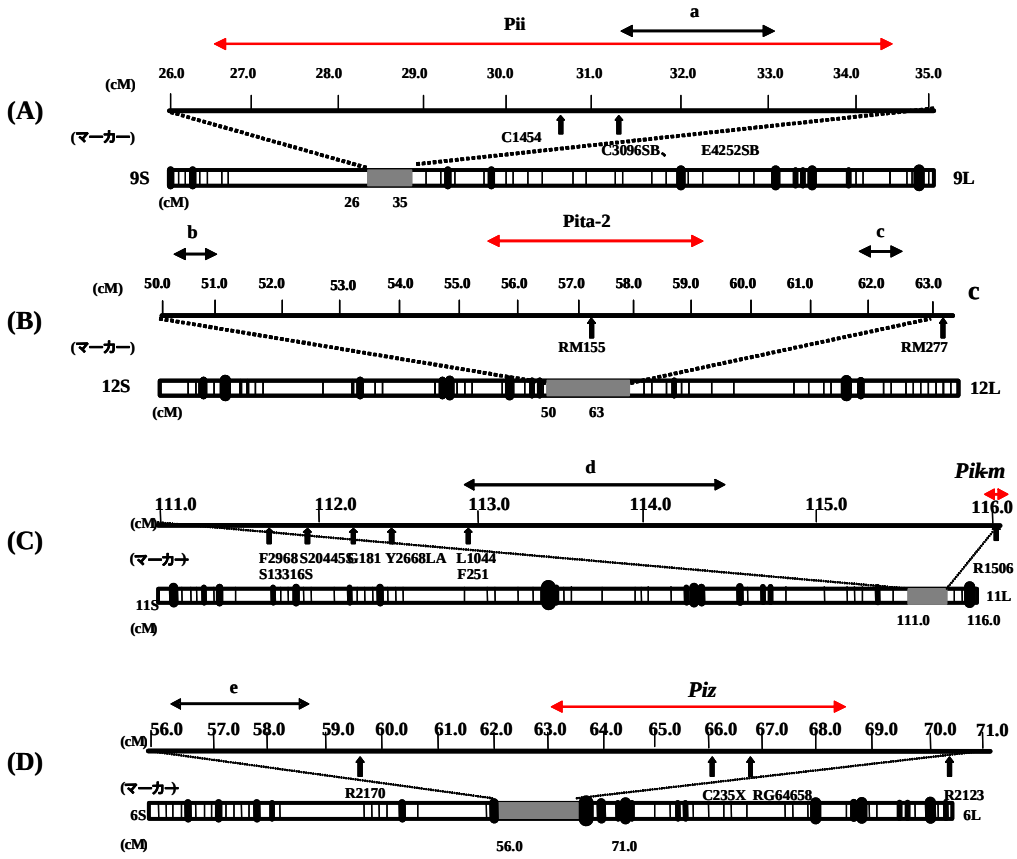
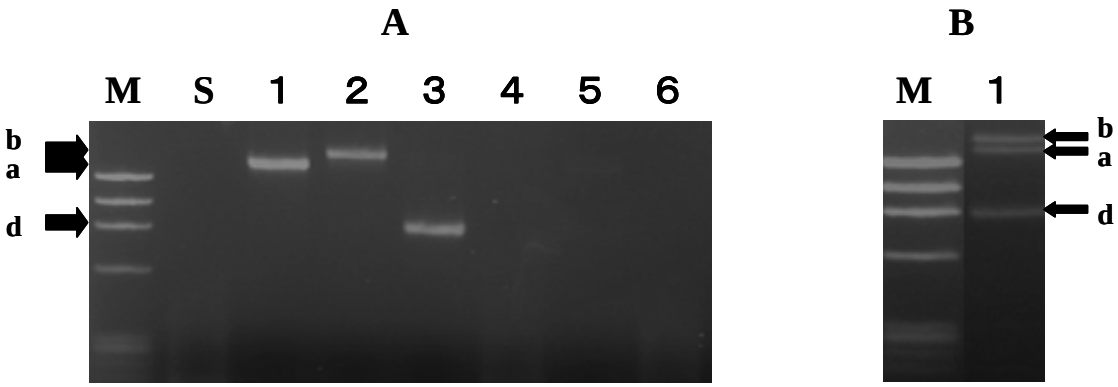


図3109-1　開発したいもち病抵抗性関連 DNA マーカーのマッピングの結果



（注）A:新潟コシヒカリ BL の個別識別例，B:4種類の BL ブレンドの識別例
a，b，d：いもち病抵抗性遺伝子関連の DNA マーカー
M：DNA 分子量マーカー，S：罹病性コシヒカリ
1，2，3，4，5，6：新潟コシヒカリ BL1号～6号

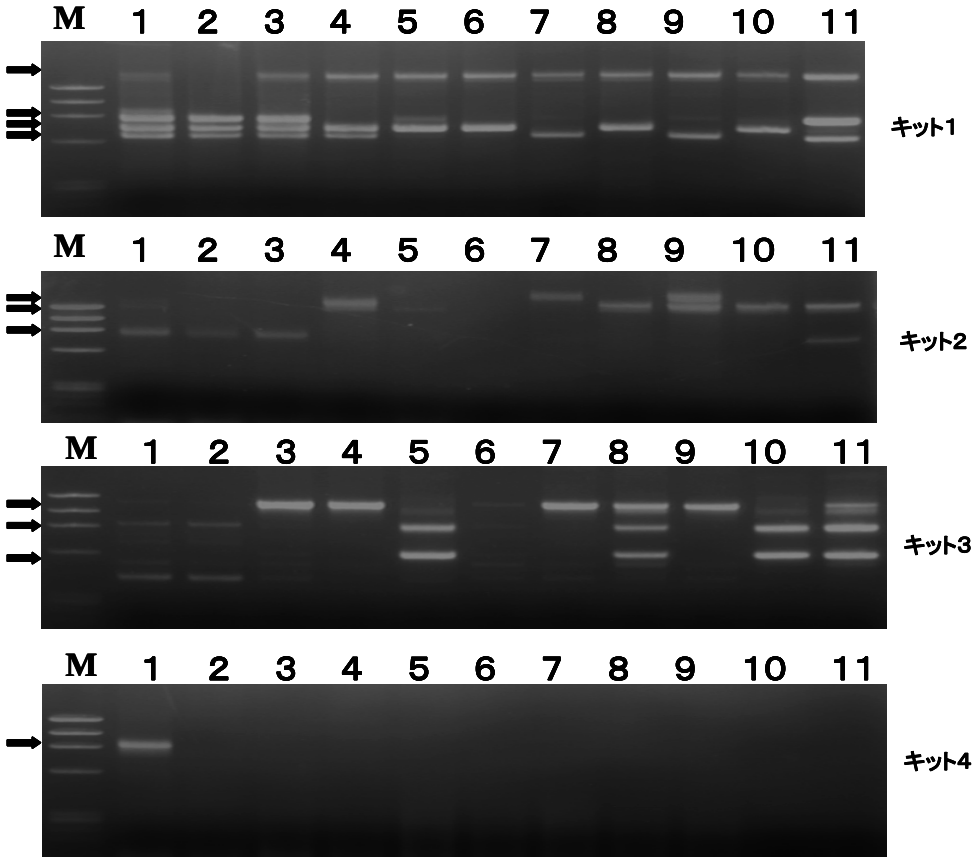
図3109-2　新潟コシヒカリ BL 識別用マルチプレックスプライマーセットの例

(ｳ) 主要品種の識別用プライマーセットの開発

作付け上位10品種および新潟コシヒカリ BL（４種類のブレンド）を識別できる４種類のプライマーセットを開発した。識別例を図3109-3に示す。

(ｴ) 試験室間共同試験の開始

上記４種類のプライマーセットによる、10品種の識別の32機関の共同試験の結果を表3109-2に示す。



1:新潟コシヒカリBL 2:コシヒカリ(福井) 3:ひとめぼれ 4:ヒノヒカリ 5:あきたこまち 6:キヌヒカリ
7:きらら397 8:はえぬき 9:ほしのゆめ 10:つがるロマン 11:ななつぼし

図3109-3　試験室間共同試験に使用した11品種の米および4種類のプライマーセット

表3109-2　平成17年度の試験室間共同試験結果のまとめ

品種名/検査機関	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
ひとめぼれ	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○
ヒノヒカリ	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○
新潟コシヒカリBL	○	○		○	○	○	○			○	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	○		
コシヒカリ	○	○		○	○	○	○			○	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	○		
ほしのゆめ	○	○			○	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○
あきたこまち	○	○		○	○	○	○	○		○				○			○		○	○	○		○	○		○	○		○		○		
ななつぼし	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○
つがるロマン	○	○	○	○		○	○	○	○	○			○	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○					○		○		
きらら397	○	○		○	○	○	○	○		○			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○
はえぬき	○	○	○	○		○	○	○		○		○	○			○	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○		○	○	○	○	○
キヌヒカリ	○	○	○	○		○	○	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○

▲　　回答なし

	品種名	正解率%
1	ひとめぼれ	97
2	ヒノヒカリ	97
3	新潟コシヒカリBL	81
4	コシヒカリ	81
5	ほしのゆめ	91
6	あきたこまち	59
7	ななつぼし	100
8	つがるロマン	59
9	きらら397	88
10	はえぬき	81
11	キヌヒカリ	94
	全て正解	43,8
	1問不正解	9,4
	2問不正解	12,5
	3問不正解	12,5

エ　考　察

種苗管理センターとの登録品種の識別データベースは今後の判別に有用と考えられる。各種新潟コシヒカリ BL のいもち病抵抗性遺伝子 *Pia*、*Pii*、*Pita-2*、*Piz* に対応する識別用プライマーを開発してマルチプレックスプライマーセットを実用化し、新潟県産コシヒカリの判別を可能にしたことは、DNA 判別による産地判別の最初の実用化例である。

作付け上位10品種および新潟コシヒカリ BL を識別できる 4 種類のプライマーセットを開発し、試験室間共同試験を開始したが、今後の改善の余地がある結果であった。

オ　今後の課題

プライマーセットの改良、試験マニュアルの改良等により、試験室間共同試験結果の改善を図る。

カ　要　約

(ｱ) PCR 用プライマーを拡充し､種苗管理センターと共同で、STS-RAPD 法による150点の登録品種の識別データベースを作成した。

(ｲ) 各種新潟コシヒカリ BL のいもち病抵抗性遺伝子 *Pia*、*Pii*、*Pita-2*、*Piz* に対応する識別用プライマーを開発し、これらを基に、実用的マルチプレックスプライマーセットをタカラバイオ社を通じて市販開始した。

(ｳ) 作付け上位10品種および新潟コシヒカリ BL ブレンドを識別できる 4 種類のプライマーセットを開発し、妥当性確認のための試験室間共同試験を32機関と開始した。

キ　文　献

中村澄子・大坪研一・伴　義之・西川恒夫・徳永國男 2006. 育種学研究. 8:79-87.

研究担当者　（大坪研一*、中村澄子）

10　イチゴDNA品種識別法の開発と試験室間共同試験による妥当性確認

ア　研究目的

輸入されるイチゴの中には、日本の品種の育成者権を侵害したり、表示品種とは異なる品種が販売されるという事例が発生している。そこで DNA 鑑定により、流通する商品果実の品種を識別する技術を確立し、これらの違法行為を証明する手段とする。

本プロジェクトでは、1) 既存のイチゴ DNA マーカーの欠点を補って安定かつ簡易なものに改良し、流通商品の品種識別技術を確立すること、2) DNA 識別技術の汎用性向上のため、技術をマニュアル化し、このマニュアルに基づいた妥当性確認試験の実施により技術の信頼性を確立する。

イ　研究方法

(ｱ) イチゴ DNA マーカーの改良と品種識別技術の確立

a イチゴの高次倍数性を考慮した DNA マーカーの明瞭化と簡易化

(a) ゲノム特異的マーカーへの改変

栽培イチゴは 8 倍体であるため、1 つの遺伝子に少なくとも 8 個の遺伝子座が存在する。既存のイチゴ品種識別用 DNA マーカーはこれら 8 個全てを PCR の対象にして増幅していた。そのため品種間で多型をもつ DNA は、多型のない DNA と比較すると増幅量が少なくシグナルが微弱となり、場合によっては誤判定が危惧された（Kunihisa et al., 2003)。そこで DNA 配列情報からクラスター解析を行い、8 座のうち多型検出に必要な最少のもの（ゲノム）のみを特異的に増幅するようプライマーを設計した。

(b) マーカーの遺伝様式の確認

栽培イチゴの諸形質に関する遺伝様式の解明およびマーカー開発の研究は主要野菜に比較すると遅れており、一部のマーカーでは遺伝様式がメンデル遺伝に従わないことが報告されている（Zhang et al., 2003)。そこで改良した全てのマーカーが遺伝的に安定であることを確認するため、「女峰」「とちひめ」「さちのか」「セセナ」の自殖系統計288個体について多型解析を行った。

(c) マーカーのマルチプレックス化の検討

マーカー遺伝子型の検出に要する労力やコストを削減するため、マーカーのマルチプレックス化を検討した。開発したマーカーの全ての組み合わせ（300 通り）から、2 対のプライマーを混合した DNA 増幅および制限酵素処理によって2マーカーが同時に解析できる組み合わせを探索した。

b 国内主要品種の DNA 多型データベースの作成、および識別精度の算出

(a) 主要品種の収集および解析

国内で育成された品種を主体に、イチゴ遺伝資源

を保存している８箇所の機関から計128品種の生葉を収集した。また韓国の試験研究機関からも、２品種の材料提供を受けた。苗の取り違えによるタイピングミスを防止するため、１品種について２場所以上から収集するように努めた。

(b) マーカー遺伝子頻度に基づいた同定精度の算出

作成したDNA多型データベースを元に、それぞれのマーカー遺伝子型の出現頻度を算出した。さらに品種同定理論（品種識別技術検討会，2003）に基づき、データベース上の各品種について、比較対象品種を100とした場合に25マーカー全ての遺伝子型が偶然一致する確率（P_I）を求めた。また実用レベルとして、P_Iが0.001（同定精度99.9%）程度になる最少のマーカー組合せを選抜した。

(イ) 識別技術のマニュアル化および試験室間共同試験

b(b)の検討結果で得られた、品種同定の精度が99.9%となるマーカーセット（15個）について、最適な実験条件（プライマー保存方法・氷上操作の徹底・酵素のメーカーや試薬量）を指定した操作マニュアルを作成した。

AOAC の基準を満たした妥当性確認試験を行うために、41サンプルのイチゴ葉を用いて全てのマーカー遺伝子型を6反復検出する試験区を設計した（図3110-1）。なお、本試験には13研究機関が参画した。

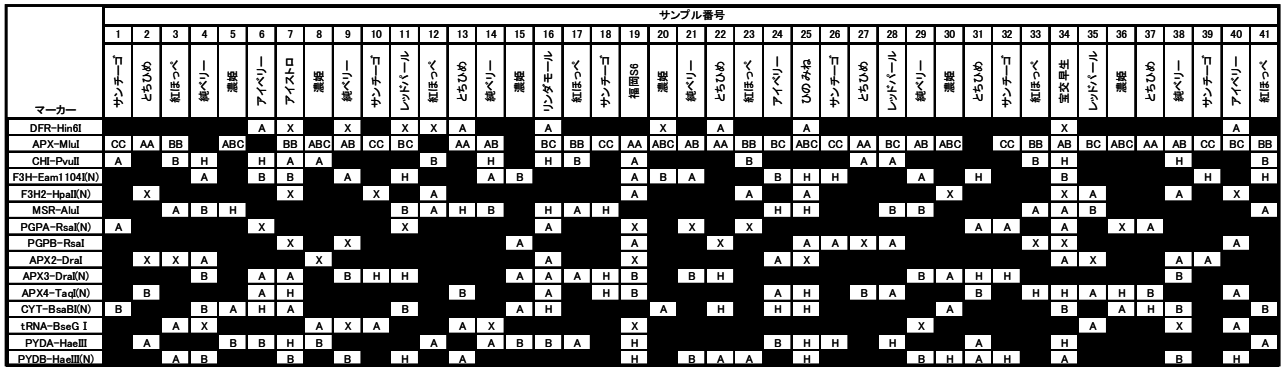


図3110-1　試験室間共同試験に選択したマーカーと想定した品種および多型
複数の品種のイチゴ葉より各マーカーの遺伝子型を６反復検出出来るよう設計した。試験では、品種名の項目を設けず、252個の升目を埋める形でマーカー遺伝子型の決定を依頼した。

ウ　研究結果

(ア) イチゴDNAマーカーの改良と品種識別技術の確立

a イチゴの高次倍数性を考慮したDNAマーカーの明瞭化と簡易化

(a) ゲノム特異的マーカーへの改変

品種間で多型を示す遺伝子座だけを特異的に増幅するようにプライマーを改変したところ、25マーカー中24マーカーについて成功した。この結果、多型のパターンが極めて明瞭になり誤判定が回避できるだけでなく、DNA のホモ接合型とヘテロ接合型の差も検出できるようになりマーカーの識別能力も向上した（図3110-2，Kunihisa et al. 2005)。

(b) マーカーの遺伝様式の確認

全てのマーカーが3：1または1：2：1に分離し、これらがメンデル遺伝に従って安定に遺伝していることが確認できた。

(c) マーカーのマルチプレックス化の検討

マルチプレックス化が可能なマーカーの組み合わせを検討した結果、８通りの組み合わせで２マーカーの同時解析が可能であった。これにより、「とちおとめ」「あまおう」「アスカルビー」は１組のマーカー分析、「さちのか」は２組のマーカー分析でデータベース上の他の品種と識別することが可能となり、識別の低コスト化および省力化が期待できる。

b 国内主要品種のDNA多型データベースの作成、および識別精度の算出

(a) 主要品種の収集および解析

収集した128品種を分析した結果、長期にわたってランナー増殖で遺伝資源を保管したために、他品種

に置き換わっているものが多く見られた。複数の保存場所で遺伝子型が一致した65品種のみをデータベースにまとめた（表3110-1）。

(b) マーカー遺伝子頻度に基づいた同定精度の算出

遺伝子型出現頻度 P_iを算出し、65品種中で最も高頻度の遺伝子型を持つ品種「八雲」でも、25マーカーを用いれば99.997%の確率で同定できることを確認した。また、これら全ての品種を99.9%程度の精度で同定可能な最少限のマーカーセットを選抜した結果、図3110-1に列挙した15のマーカーを併用することにより目的精度が達成できることを見出した。（松元ら 2006）

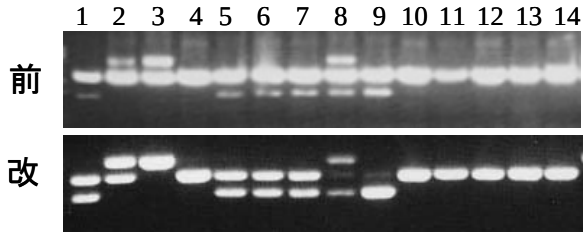


図3110-2 プライマー改変により明瞭化したAPX-MluIマーカー

1)とよのか 2)女峰 3)とちおとめ 4)章姫 5)さちのか 6)アイベリー 7)レッドパール 8)濃姫 9)サンチーゴ 10)ピーストロ 11)アイストロ 12)紅ほっぺ 13)けいきわせ 14)Cesena

表3110-1 DNA多型リスト作成に用いた65品種

アイストロ	サマーベリー	はるのか	八雲
アイベリー	沢ベリー	はるよい	リンダモール
あかしゃのみつこ	サンチーゴ	ピーストロ	麗紅
あかねっ娘	しずたから	ひのみね	レッドパール
章姫	しずちから	ひみこ	Aiko
アスカウェイブ	しずのか	媛育	Elsanta
アスカルビー	しゅうこう	福岡S6号	Pajaro
越後姫	スルガエース	福羽	Tioga
エバーベリー	セレナータ	ペチカ	セコイア
大石四季成2号	ダナー	紅ほっぺ	苺香
きたえくぼ	とちおとめ	ベリースター	紅早
北の輝	栃の峰	ベルルージュ	
久能早生	とちひめ	芳玉	
けいきわせ	とねほっぺ	宝交早生	（65品種）
紅寿	とよのか	堀田ワンダー	
さがほのか	女峰	マラー	
さちのか	濃姫	みよし	
さつまおとめ	はつくに	明宝	

(イ) 識別技術のマニュアル化および試験室間共同試験

試験室間共同試験による妥当性確認試験では、操作上の不備があった1機関を除く12機関より有効な回答を得た。一部の機関でタイピング枠の間違いやプロトコルの逸脱が見られたため、該当するマーカーについては無効回答とした。しかし全てのマーカーについて、AOAC の定める10機関の基準を満たした。また回答を精査した結果、2機関において供試したサンプルの手違い等が判明したため、改めて試験を行った。

有効回答について感度、擬陽性率、特異性、偽陰性率を算出した結果、この試験法の再現性が極めて高いことが示された（表3110-2, 上田ら 2006）。

エ 考 察

実用場面において品種鑑定技術に求められる点は、分析場所・機器・分析者を問わず、誤判定の起こりえない安定な技術であること、そして判定結果にどの程度の信頼性があるのか確率で示せることであると考えられる。

我々は、マーカーをゲノム特異的に改良することにより、著しく明瞭となり、かつ識別能力の向上した識別マーカーを作出した。さらに本技術の妥当性を試験室間共同試験により確認し、技術的に十分安定したものであることを証明した。一方、品種の多型データベースを作成し、品種同定理論に裏付けられた同定精度（確率）を算出した。妥当性が確認された15マーカーだけでも、ほとんどの品種で99.9%の精度が達成できる。

これらのことから本技術は、品種鑑定技術として実用レベルに十分達したと考えられる。

オ 今後の課題

(ア) イチゴ DNA マーカーの改良と品種識別技術の確立

本法はイチゴの果実、生葉など未加工のサンプルにしか適用が確認されていない。生鮮果実に次いで商品性の高いジャム等の加工品では、現時点では品種識別法が確立されておらず、今後の課題となっている。

(イ) 識別技術のマニュアル化および研究室間共同試験

本プロジェクトでは、25のマーカーのうち15マーカーでの妥当性が確認されたが、残り10マーカーについては未検証である。

表3110-2　研究室間試験により明らかとなったマーカーの成績

マーカー	多型	成績(%) 感度 mean ± SD	偽陰性率 mean ± SD	特異性 mean ± SD	偽陽性率 mean ± SD	有効回答数（13機関中）
DFR-Hin6I	A	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	12
	X	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
F3H2-HpaII(N)	A	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	11
	X	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
PGPA-RsaI(N)	A	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	12
	X	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
PGPB-RsaI	A	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	12
	X	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
APX2-DraI	A	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	12
	X	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
tRNA-BseGI	A	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	12
	X	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
CHI-PvuII	A	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	12
	B	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
	H	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
F3H-Eam1104I(N)	A	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	11
	B	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
	H	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
MSR-AluI	A	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	11
	B	91 ± 30	9 ± 30	100 ± 0	0 ± 0	
	H	100 ± 0	0 ± 0	95 ± 15	5 ± 15	
APX3-DraI(N)	A	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	11
	B	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
	H	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
APX4-TaqI(N)	A	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	11
	B	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
	H	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
CYT-BsaBI(N)	A	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	12
	B	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
	H	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
PYDA-HaeIII	A	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	12
	B	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
	H	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
PYDB-HaeIII(N)	A	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	11
	B	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
	H	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
APX-MluI	CC	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	11
	BC	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
	ABC	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
	BB	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
	AB	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	
	AA	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	

カ　要　約

(ア) イチゴ DNA マーカーの改良と品種識別技術の確立

a イチゴの高次倍数性を考慮した DNA マーカーの明瞭化と簡易化

イチゴの品種間多型を検出する25マーカーを改良した。これにより明瞭で誤判定しにくく、遺伝的にも安定で、かつ DNA のホモ接合体とヘテロ接合体の差も検出できる共優性マーカーが得られた。またマルチプレックス法により、２マーカー同時検出の有効性が確認できたため、主要な品種については１～２組の反応系での簡易識別も可能である。

b 国内主要品種の DNA 多型リストの作成、および同定精度の算出

国内育成品種を中心に65品種の遺伝子型を25マーカーで解析し、データベース化した。このデータベースを参照して品種が未知であるサンプルを同定する場合、ほとんどの品種が15マーカーで99.9%以上の精度で同定できることを示した。

(イ) 識別技術のマニュアル化および研究室間共同試験

99.9%の精度で品種同定が可能なマーカーセット（15マーカー）について、AOAC の定める基準に従って13研究機関で共同試験を行った。その結果、全てのマーカーで最低11機関の有効回答を得、AOAC の基準を満たした。15のうち１つのマーカーで誤判定が生じ感度が91%となったが、その他14マーカーでは100%となり、極めて高い再現性が示された。

キ　引用文献

DNA 品種識別技術検討会2003.　植物の品種識別における品種同定理論. 植物の DNA 品種識別についての基本的留意事項-技術開発と利用のガイドライン-別添資料

Kunihisa M, et al. 2003. Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. *Euphytica*. 134(2). 209-215

Zhang Z, et al. 2003. Single-copy RAPD marker loci undetectable in octoploid strawberry.

Journal of Horticultural Science & Biotechnology 78, 689-694

Kunihisa M, et al. 2005a. CAPS markers improved by cluster-specific amplification for identification of octoploid strawberry (Fragaria × ananassa Duch.)

cultivars, and their disomic inheritance. *Theoretical and Applied Genetics*. 110, 1410 － 1418

松元ら2006. 日本のイチゴ品種同定に必要な DNA マーカーの選定園芸学会. 園芸学会雑誌. 75 (別1). 323

上田ら 2006. イチゴ DNA 品種判別法の試験室間共同試験による妥当性確認. 園芸学会雑誌. 75 (別1). 324

研究担当者（國久美由紀*、松元哲、上田浩史）

11 X線分析を用いたコメ及び栽培土壌の成分分析技術の開発

ア 研究目的

食品安全性確保のため、重金属元素を始めとする各種成分について簡易迅速分析技術を開発する必要がある。また、種々の岩石・鉱物[2] に由来する栽培土壌から、コメへの重金属元素の動態及びその分布状態を解明し、汚染部除去などの加工による重金属汚染のリスクを低減することが重要である。本課題では、コメ粒の重金属元素の動態把握を目的とし、元素の分布状態・含有量・結合状態を把握するため、煩雑な抽出操作等を必要としない固体状態での簡易な物理分析技術の開発を目指す。

イ 研究方法

(ｱ) エネルギー分散型蛍光 X 線分析（XRF-EDS)、波長分散型蛍光 X 線分析（XRF-WDS)、エネルギー分散型分析走査電子顕微鏡（SEM-EDS)、X 線回折分析（XRD）等[1,3] を用いて、各種元素分析・観察を行った。XRF-EDS では、コメ粒各部位におけるの重金属元素定量のため、新たに試料ホルダーを作製するとともに、コリメータ（X 線の絞り部分）に Cd 検出用のフィルターを装着し、定量限界向上を試みた。XRF-WDS では、X 線強度計算により Cd 含有量測定に必要な X 線強度を算出した。

(ｲ) 汚染土壌中重金属のコメ可食部への移行を把握するため、高濃度の重金属を含有させた土壌中でコシヒカリをポット栽培し、収穫後のコメ粒を玄米、糠、胚芽、胚乳に分離したのち分析した。

(ｳ) 一般土壌栽培でもコメ粒に重金属元素が検出されるので、各種元素濃集部位を特定するため、圃場で開花後からコメの結実に至るまでのコメ試料を採取し、SEM-EDS による時系列分析及び観察を行った。

ウ 研究結果

(ｱ) XRF-EDS に Cd 用フィルター装着を行ったが、検出限界は7ppm であった。しかし、XRF-WDS において X 線発生源を強力化すれば、0.1ppm オーダーの分析が可能となることが明らかとなった。

(ｲ) a SEM-EDS によりコメ粒での詳細な元素分布が判明し[4]、元素の偏在性が明瞭に観察された（図3111－1)。

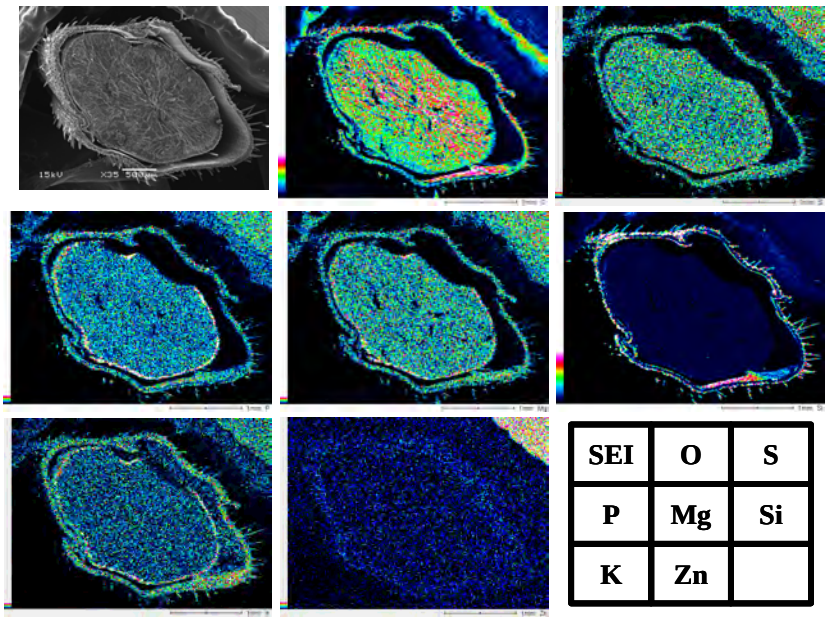


図3111－1 コメ粒短軸断面における元素分布（SEI: 二次電子像）

b コメ粒に、Zn と Cd とが共存する分布域が見出された（図3111－2）が、Cd が Zn と同じ12族元素であるために同一挙動を示すことが原因と考えられる。

c コメ粒形成時の還元環境では、12族元素は硫化物、硫酸塩等の S を有するサイトとの結合により固定されやすい。したがって、コメ粒では周辺部に S が分布するために、そこに微量の Zn が存在し、Cd も共存するといえる。さらにコメ粒では、O と S との分布には逆相関関係が認められ、中心部に O、外縁部に向かい S が分布することが判明した。

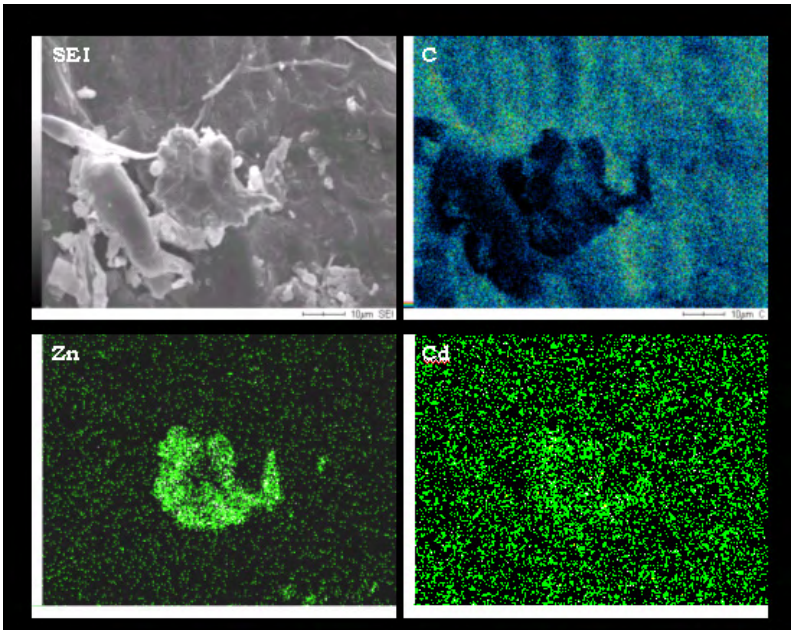


図3111－2　糠表面の Zn と Cd の点在と共存状態。Zn の局在部位に Cd も存在する。

(ウ) 各種重金属は、開花期以後、とくに水分が必要な時期に、籾等を通して糠が形成される際にコメ外縁部に集積することが明らかとなった。食品成分表（四訂）による Zn 含有量データは、糠においてタンパク質以外との結合の存在可能性を示唆している（図3111－3）。

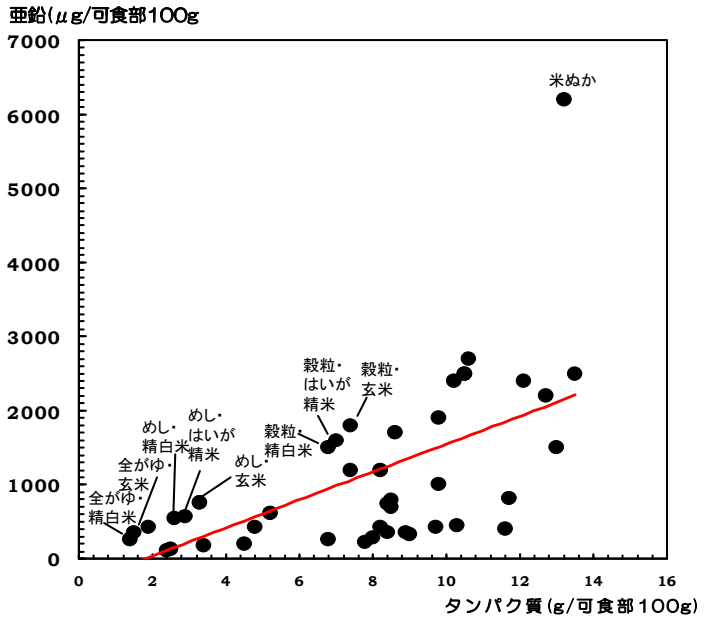


図3111－3　食品成分表（四訂）による穀類における Zn 量とタンパク質量との関係。

エ　考　察

蛍光X線分析においてX線出力を強力化すれば、複雑な前処理操作を必要とせずとも微量の重金属元素定量が可能となる。また、重金属元素含有量はコメ粒表面に向かい増加するとともに、糠や籾においては局部的に存在する。このため、コメ粒に含まれる重金属元素の含有量を議論する場合には分布状態を考慮しなければならない。さらにCd等12族元素を取り除くためには、精米（研磨）操作において、短径の約50%以上行えば、糠及び可食部で問題となる元素の除去が可能となる。

オ　今後の課題

糠及びコメ粒内における Cd 等の重金属元素は異なる化合物として存在するため、XRF-WDS において10kW 程度の X 線源を用いれば定性・定量が可能となる。このことから今後、分析迅速性を念頭において、強力 X 線源を用いた実験室用汎用型波長分散型蛍光X線分析装置の開発が必要である。また、土壌からコメへの重金属移行を最小限におさえるためには、コメ形成時期における重金属元素濃集機構の解明を進め、施肥・資材投与の適期について研究を推進することが不可欠である。

カ　要　約

コメ粒の重金属元素の定量には、前処理操作の簡便な蛍光X線分析が有効であるが、さらにX線出力を強力する必要がある。コメ粒中の重金属元素は偏在しており、重金属元素の含有量を議論する場合には分布状態を考慮することが不可欠である。コメ粒の短径の約50%以上精米すれば、可食部で問題となる元素の除去が可能となる。

キ　引用文献

1）Hatta, T., Namoto, S. and Kainuma, K. 2003 A surface analytical approach to the structure of starch granules. *J. Appl. Glycosci.* 50：159-162.

2）木股三善・篠原也寸志・興野純・八田珠郎2003 原色新鉱物岩石図鑑. 木股三善・宮野敬（編）. 北隆館：346p.

3）貝沼圭二・八田珠郎 2003　澱粉粒と固体構造. 澱粉科学の事典. 不破英次他（編）. 朝倉書店. :39-49, 58-73.

4）八田珠郎・根本清子・山本和貴・貝沼圭二 2006 穀類可食部における元素分布のエネルギー分散型走査電子顕微鏡による解析. 応用糖質講要. 53.

研究担当者（八田珠郎2002～2003年度*、山本和貴2004年度）